



**Ana Rita da Silva  
Nogueira**

**Fermentação Contínua de Mosto com Leveduras  
Imobilizadas em Alginato**

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química realizada sob a orientação científica da Doutora Ana Xavier e da Doutora Inês Portugal do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Engenheiro Filipe Centeno da Proenol.

## **o júri**

presidente

**Prof. Dr. João Manuel da Costa e Araújo Pereira Coutinho**

Professor associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Dra. Ana Paula Mora Tavares**

Investigadora Auxiliar do LSRE – Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

**Prof. Dra. Ana Maria Rebelo Barreto Xavier**

Professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Prof. Dra. Maria Inês Purcell de Portugal Branco**

Professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Eng. Filipe Miguel Monteiro Centeno da Costa**

Director de Produção e I&D da Proenol – Indústria Biotecnológica, Lda

## **agradecimentos**

Durante a realização deste trabalho foram várias as pessoas que directa ou indirectamente contribuíram para o seu desenvolvimento a quem gostaria de agradecer.

À Professora Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier e à Professora Doutora Maria Inês Purcell de Portugal Branco agradeço todo o apoio e incentivo e principalmente a orientação que me concederam, tão importante na realização deste trabalho bem como na minha formação pessoal e profissional.

À Doutora Maria de Fátima Teixeira, administradora da Proenol, agradeço a oportunidade que me concedeu de realizar um estágio em ambiente industrial, permitindo-me adquirir competências que em ambiente académico não seriam possíveis de alcançar.

Ao Engenheiro Filipe Centeno, Director de Produção e I&D da Proenol agradeço todo o apoio, incentivo, orientação e disponibilidade demonstrados ao longo deste trabalho.

A todos os colaboradores da Proenol agradeço a boa disposição e simpatia demonstrados. Especialmente aos colaboradores do laboratório agradeço os conhecimentos transmitidos e o apoio demonstrado ao longo do meu trabalho. Em particular, aos colaboradores da produção agradeço a disponibilidade e colaboração prestados na recolha de amostras.

Ao Professor Doutor Fernando Manuel de Jesus Domingues agradeço todo o apoio, orientação e disponibilidade demonstrados na realização das análises em HPLC.

Finalmente, a todos os professores que contribuíram para a minha formação ao longo do curso, gostaria de agradecer os conhecimentos transmitidos que me permitiram adquirir competências para a minha formação profissional.

## palavras-chave

Fermentação alcoólica, processo contínuo, reator fluidizado com reciclo, levedura imobilizada, *Saccharomyces cerevisiae*.

## resumo

Este estudo, realizado na Proenol entre Novembro/08 e Abril/09, consistiu no desenvolvimento e avaliação do comportamento de um reator biológico de leite fluidizado com reciclo para a fermentação alcoólica de mosto, com levedura *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em alginato (ProRestart<sup>®</sup>), com vista à sua implementação a nível industrial.

Numa primeira fase realizaram-se ensaios laboratoriais de fermentação em descontínuo para avaliar a influência da carga de leveduras imobilizadas, reutilização das leveduras imobilizadas, agitação do meio e temperatura. Verificou-se que a velocidade de consumo de açúcares aumenta com a carga de leveduras sendo praticamente independente da reutilização das leveduras e da agitação do meio. Foi realizado um estudo de difusão de açúcares com leveduras termicamente inactivadas para explicar a diminuição abrupta da concentração de açúcares nos instantes iniciais da fermentação, sendo proposto um modelo de pseudo 2<sup>a</sup> ordem. Este modelo conjuntamente com a equação cinética de Michaelis-Menten, mostrou-se adequado para modelar a velocidade de consumo de açúcares durante a fermentação de mosto com a levedura *S. cerevisiae* imobilizada em alginato. A energia de activação aparente obtida foi de  $17,8 \pm 0,4$  kcal/mol.

Numa segunda fase testou-se um reator de leite fluidizado com reciclo (R=950) para a fermentação contínua de mosto utilizando as leveduras imobilizadas ProRestart<sup>®</sup>. Verificou-se que tanto o teor de etanol formado como a velocidade de consumo de açúcares são superiores no processo contínuo (cerca de 3 vezes para a velocidade de consumo de açúcar) comparativamente aos resultados obtidos no processo descontínuo em condições idênticas. Conclui-se este estudo com um pré-estudo de viabilidade económica do processo contínuo, com base no custo da levedura imobilizada, tendo-se constatado que, nas condições estudadas, o processo não é economicamente viável. A implementação industrial deste tipo de reator requer optimização.

**keywords**

Alcoholic fermentation, continuous process, fluidized bed reactor with recycle, immobilized yeast, *Saccharomyces cerevisiae*.

**abstract**

This work was carried out in Proenol between November/08 and April/09, aiming the development of a biological reactor for the continuous alcoholic fermentation of grape must by *Saccharomyces cerevisiae* yeasts immobilized on alginate beads (ProRestart®).

Initially, batch fermentations were performed at laboratorial scale in cotton-plugged flasks to evaluate the influence of immobilized yeast charge, yeast reutilization, agitation and temperature. The rate of consumption of sugars increases with the yeast charge and is practically independent of yeast reutilization and agitation. The initial abrupt decrease of sugar concentration was attributed to adsorption and not to fermentation. This was confirmed with a diffusion study using alginate beads with thermally inactivated immobilized yeasts. A pseudo 2<sup>nd</sup> order model was proposed to explain the results and used in conjunction with the Michaelis-Menten equation to model grape must fermentation with *S. cerevisiae* alginate beads. The influence of temperature on the rate of fermentation was explained by an Arrhenius type equation with an apparent activation energy of  $17,8 \pm 0,4$  kcal/mol.

In a second stage grape must fermentation was performed in the presence of ProRestart® yeasts in a continuous fluidized bed reactor with recycle (R=950). In this reactor both ethanol production rate and sugar consumption rate were higher in comparison with the results obtained in the batch fermentations under similar conditions (sugar consumption rate was approx. 3 times higher).

Finally, the economic viability of the continuous process was evaluated. As a conclusion, under the studied conditions the process is economically unviable and therefore prior to industrial scale installation the operating conditions should be optimized.

## Sumário

Lista de Figuras .....	iii
Lista de Tabelas .....	v
Nomenclatura.....	vii
1 Introdução.....	1
2 Revisão Bibliográfica .....	3
2.1 Leveduras.....	3
2.1.1 Características Gerais .....	3
2.1.2 Imobilização de Biocatalisadores .....	4
2.1.3 Limitações à Transferência de Massa em Sistemas Imobilizados.....	9
2.1.4 Cinética de Michaelis-Menten.....	10
2.2 Processo Fermentativo.....	12
2.2.1 Bioquímica da Fermentação .....	12
2.2.2 Factores que Afectam o Desempenho Fermentativo.....	14
2.2.3 Produção de Vinho .....	15
2.2.4 Reactores Biológicos .....	19
2.2.4.1 Modo de Operação: Contínuo vs. Descontínuo.....	22
3 Materiais e Métodos .....	29
3.1 Microorganismo .....	29
3.2 Mosto .....	29
3.3 Métodos Analíticos.....	29
3.3.1 Biomassa.....	29
3.3.2 Açúcares .....	30
3.3.3 Etanol.....	31
3.4 Difusão de Açúcar em Esferas de Alginato.....	31
3.5 Fermentação em Descontínuo .....	32
3.5.1 Influência da Temperatura.....	33
3.6 Fermentação em Contínuo.....	33
3.6.1 Montagem experimental.....	34
3.6.2 Esterilização do material .....	35
3.6.3 Funcionamento .....	35

4	Resultados e discussão .....	37
4.1	Cinética de Difusão .....	37
4.2	Fermentação em Descontínuo .....	42
4.2.1	Influência da Carga de Levedura Imobilizada.....	42
4.2.1.1	Crescimento de Células Livres .....	54
4.2.2	Influência da Temperatura.....	56
4.2.2.1	Energia de Activação.....	60
4.3	Fermentação em Contínuo.....	61
4.4	Estudo de Viabilidade Económica.....	64
5	Conclusões e Propostas de Trabalho Futuro.....	65
5.1	Conclusões.....	65
5.2	Propostas de Trabalho Futuro.....	66
6	Referências Bibliográficas.....	69
7	Anexos.....	77
	ANEXO A: Difusão de Açúcares .....	77
	ANEXO B: Fermentação Descontínua de Mosto sem Agitação do Meio .....	78
	ANEXO C: Fermentação Descontínua de Mosto com Agitação do Meio .....	83
	ANEXO D: Efeito da Temperatura na Fermentação Descontínua de Mosto.....	84
	ANEXO E: Fermentação Contínua de Mosto .....	87

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Métodos de imobilização de biocatalisadores (adaptado de Dalla-Vicchia <i>et al.</i> , 2004).....	7
Figura 2: Via de metabolização dos açúcares pela levedura (Carvalho, 2007).....	13
Figura 3: Esquema do processo de fabrico de vinho a) branco e b) tinto (adaptado de Macedo <i>et al.</i> , 2003). ....	16
Figura 4: Esquema e imagem da montagem experimental do processo de fermentação contínua de mosto.....	34
Figura 5: a) Concentração de açúcar para diferentes cargas de ProRestart® termicamente desactivado; b) ampliação da zona inicial. ....	38
Figura 6: Quantidade de açúcar adsorvida ao longo do tempo, para diferentes cargas de ProRestart®. ....	40
Figura 7: Concentração de açúcar ao longo do tempo e modelo descritivo da difusão dos açúcares para o interior das esferas, para diferentes cargas de ProRestart® termicamente desactivado.....	42
Figura 8: Concentração de açúcares na fermentação descontínua de mosto, sem agitação do meio reaccional, para as diferentes cargas de ProRestart®, com uma primeira utilização das esferas. ....	43
Figura 9: Concentração de açúcares na fermentação descontínua de mosto, sem agitação do meio reaccional, para as diferentes cargas de ProRestart®, com reutilização das esferas. ....	44
Figura 10: Velocidade de consumo de açúcares, para as diferentes cargas de ProRestart®, para a a) primeira utilização e b) segunda utilização das esferas, nos ensaios de fermentação em descontínuo sem agitação do meio reaccional.....	45
Figura 11: Concentração de açúcares ao longo do tempo na fermentação descontínua de mosto, para diferentes cargas de ProRestart®, com a) primeira utilização e b) segunda utilização das esferas (os pontos representam os resultados experimentais e as curvas o ajuste à equação de Michaelis-Menten).....	49
Figura 12: Concentração de açúcares ao longo do tempo na fermentação descontínua de mosto com agitação do meio reaccional, para cargas de ProRestart® de 100 g/L e 200 g/L.....	51



Figura 13: Velocidade de consumo de açúcares, para cargas de 100 g/L e 200 g/L de ProRestart <sup>®</sup> , na fermentação descontínua de mosto com agitação do meio reaccional.	51
Figura 14: Concentração de açúcar presente no mosto e teor de etanol formado ao longo do tempo na fermentação descontínua de mosto com agitação do meio reaccional, para cargas de ProRestart <sup>®</sup> de 100g/L e 200g/L.	52
Figura 15: Densidade óptica ao longo do tempo para a a) primeira utilização e b) reutilização das esferas nos ensaios em meio não agitado, para diferentes cargas de ProRestart <sup>®</sup> . (No canto superior direito está representada uma ampliação da zona inicial).	54
Figura 16: Densidade óptica ao longo do tempo para as cargas de ProRestart <sup>®</sup> de 100g/L e 200g/L, nos ensaios em meio agitado (pontos a cheio) e em meio não agitado (pontos sem preenchimento).	55
Figura 17: Concentração de açúcares ao longo do tempo na fermentação descontínua de mosto, para diferentes temperaturas, utilizando 150 g/L de ProRestart <sup>®</sup> .	57
Figura 18: Velocidade de consumo de açúcar na fermentação descontínua de mosto, a diferentes temperaturas, para uma carga de ProRestart <sup>®</sup> de 150 g/L.	58
Figura 19: Concentração de açúcar (pontos sem preenchimento) e teor de etanol formado (pontos a cheio) ao longo do tempo na fermentação descontínua de mosto para as temperaturas de 19,5 °C e 10 °C.	59
Figura 20: Linearização da equação de Ahrenius.	61
Figura 21: Concentração de açúcar residual e teor de etanol à saída do fermentador contínuo operado com um caudal de alimentação constante de 0,6 mL/min.	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Vantagens e desvantagens da utilização de sistemas de biocatalisadores imobilizados. ....	5
Tabela 2: Vantagens e desvantagens dos diferentes tipos de operação de reactores.....	20
Tabela 3: Vantagens e desvantagens dos diferentes tipos de biorreactores que operam com células imobilizadas.....	22
Tabela 4: Características de alguns processos de fermentação alcoólica estudados com levedura do género <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	23
Tabela 5: Resultados experimentais e valores calculados referentes ao estudo de difusão de açúcares. ....	38
Tabela 6: Parâmetros cinéticos obtidos a partir da linearização da equação cinética de pseudo 2ª ordem.....	41
Tabela 7: Velocidades de consumo de açúcar, respectivos erros associados e coeficiente de correlação, para as diferentes cargas de ProRestart®, nos ensaios de fermentação em descontínuo, sem agitação do meio reaccional.....	46
Tabela 8: Velocidade de consumo e velocidade específica de consumo de açúcares para as diferentes cargas de ProRestart®, com uma primeira utilização das esferas e a sua reutilização, na fermentação descontínua sem agitação do meio. ....	47
Tabela 9: Parâmetros $K_m$ e $r_{max}$ da equação de Michaelis-Menten para a primeira utilização das esferas e a sua reutilização, na fermentação descontínua de mosto sem agitação do meio. ....	48
Tabela 10: Velocidade de consumo de açúcar na fermentação descontínua de mosto com e sem agitação do meio reaccional, para cargas de ProRestart® de 200 g/L e 100 g/L..	51
Tabela 11: Velocidade de consumo de açúcar e respectivo erro associado no processo de fermentação em descontínuo realizado a diferentes temperaturas. ....	58
Tabela 12: Dados e resultados referentes ao processo de fermentação em contínuo. ....	63
Tabela 13: Velocidade de consumo de substratos no processo contínuo e no descontínuo.	63
Tabela A.1: Dados referentes ao ensaio de difusão de açúcares para o interior das esferas, para diferentes cargas de ProRestart.....	77
Tabela B.1: Dados referentes à primeira utilização e reutilização das esferas de ProRestart® com carga de 100 g/L, na fermentação descontínua de mosto sem agitação do meio.	78

Tabela B.2: Dados referentes à primeira utilização e reutilização das esferas de ProRestart® com carga de 150 g/L, na fermentação descontínua de mosto sem agitação do meio.	79
Tabela B.3: Dados referentes à primeira utilização e reutilização das esferas de ProRestart® com carga de 200 g/L, na fermentação descontínua de mosto sem agitação do meio.	80
Tabela B.4: Dados referentes à primeira utilização e reutilização das esferas de ProRestart® com carga de 250 g/L, na fermentação descontínua de mosto sem agitação do meio.	81
Tabela B.5: Dados referentes à primeira utilização e reutilização das esferas de ProRestart® com carga de 320 g/L, na fermentação descontínua de mosto sem agitação do meio.	82
Tabela C.1: Dados referentes à fermentação descontínua de mosto com agitação do meio para as cargas de ProRestart® de 100 g/L e 200 g/L.	83
Tabela D.1: Dados referentes à fermentação descontínua de mosto com uma carga de ProRestart® de 150 g/L à temperatura de 24,5 °C.	84
Tabela D.2: Dados referentes à fermentação descontínua de mosto com uma carga de ProRestart® de 150 g/L à temperatura de 21,5 °C.	84
Tabela D.3: Dados referentes à fermentação descontínua de mosto com uma carga de ProRestart® de 150 g/L à temperatura de 19,5 °C.	85
Tabela D.4: Dados referentes à fermentação descontínua de mosto com uma carga de ProRestart® de 150 g/L à temperatura de 15,0 °C.	85
Tabela D.5: Dados referentes à fermentação descontínua de mosto com uma carga de ProRestart® de 150 g/L à temperatura de 10,0 °C.	86
Tabela E.1: Dados referentes à fermentação contínua de mosto utilizando o ProRestart®.	87

## NOMENCLATURA

A - factor pré exponencial

ADP - adenosina-5'-difosfato

ATP - adenosina-5'-trifosfato

$C_L$  - razão entre as fases sólida e líquida ( $g_{esf}/L_{mosto}$ )

$C_r$  - carga de esferas por unidade de volume ( $g_{esf}/L_{reac}$ )

DO - densidade óptica

$E_a$  - a energia de activação (cal/mol)

$[E]_t$  - concentração total de enzima (g/L)

F-6-P - frutose-6-fosfato

G-6-P - glucose-6-fosfato

G6P-DH - glucose-6-fosfato desidrogenase

HK - hexocinase

HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência

k - constante cinética ( $h^{-1}$ )

$k_{ad}$  - constante de velocidade de adsorção ( $g_{esf}/g_{aç} \cdot min$ )

$M_{aç/esf}$  - massa de açúcar difundida por grama de esferas ( $g_{aç}/g_{esf}$ )

$M_{dif,aç}$  - massa de açúcar difundida (g)

$M_{i,aç}$  - massa inicial de açúcar (g)

$M_{f,aç}$  - massa final de açúcar (g)

$K_m$  - constante de Michaelis-Menten (g/L)

NADP<sup>+</sup> - nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato

NADPH - nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato reduzida

PGI - fosfoglucoase isomerase

q - quantidade de açúcar adsorvida ( $g_{aç}/g_{esf}$ )

$q_e$  - quantidade de açúcar adsorvida no equilíbrio ( $g_{aç}/g_{esf}$ )

$q_s$  - velocidade específica de consumo de açúcar ( $g_{aç}/g_{esf} \cdot h$ )

$Q_i$  - caudal mássico de alimentação ( $g_{mosto}/h$ )

r - velocidade de reacção (g/L.h)

R - constante dos gases perfeitos (1,987 cal/mol.K)

$r^2$  - coeficiente de correlação

$r_0$  - velocidade inicial de consumo de substrato (g/L.h)

$r_{\text{máx}}$  - velocidade máxima de reacção (g/L.h)

$r_{\text{SW}}$  - velocidade de consumo de substrato por unidade de massa de ProRestart<sup>®</sup> ( $\text{g}_{\text{aç}}/\text{g}_{\text{esf}}\cdot\text{h}$ )

$S$  - concentração de substrato (g/L)

$S_0$  - concentração inicial de substrato (g/L)

$S_{\text{e,b}}$  - concentração de açúcar no equilíbrio (g/L)

$S_f$  - concentração final de açúcar (g/L)

$t$  - tempo (h)

$T$  - temperatura (°C ou K)

$T_{\text{max}}$  - temperatura máxima (°C)

$T_{\text{op}}$  - temperatura óptima (°C)

$v_i$  - caudal volumétrico à entrada do reactor (L/h)

$v_f$  - caudal volumétrico à saída do reactor (L/h)

$V_L$  - volume de mosto (mL)

$W$  - massa de catalisador (esferas secas) (g)

$\rho$  - densidade do mosto (g/L)

## 1 INTRODUÇÃO

Um dos principais processos associados à produção de vinho é a fermentação alcoólica que consiste na conversão dos açúcares presentes no mosto em etanol e dióxido de carbono, sendo a levedura utilizada a espécie *Saccharomyces cerevisiae*.

No que respeita à utilização de biocatalisadores em processos industriais, diversas técnicas têm sido desenvolvidas com o intuito de facilitar a sua manipulação e conferir determinadas características de forma a torná-los mais resistentes às condições do meio envolvente. Desta forma surgiram as técnicas de imobilização de biocatalisadores que facilitam a sua utilização e manuseio e protege-os de condições adversas oferecendo assim vantagens tecnológicas e económicas.

A produção de vinho é um processo já amplamente estudado e conhecido. Deste modo a sua aplicação à escala industrial tornou-se num processo sólido do ponto de vista tecnológico e é tido como o método cujas condições de operação se encontram no seu estado óptimo do ponto de vista técnico e económico.

Novas técnicas têm sido utilizadas no sentido de desenvolver novos processos de produção de vinho. Desta forma o processo em contínuo tem sido alvo de estudos de modo a determinar as vantagens da sua aplicação relativamente ao convencional modo de operação descontínuo.

O objectivo principal deste trabalho consistiu em estudar o processo de produção de vinho em contínuo para implementação à escala industrial, com leveduras imobilizadas em alginato, produto designado comercialmente por ProRestart<sup>®</sup>. Assim começou-se por estudar o processo de fermentação alcoólica em descontínuo, realizando-se ensaios para determinar a influência da carga de leveduras imobilizadas, reutilização das leveduras imobilizadas, agitação do meio e temperatura na cinética de fermentação. Paralelamente efectuou-se um estudo de difusão de açúcares para o interior das esferas, que teve como objectivo descrever o decréscimo rápido da concentração de açúcar nos instantes iniciais do processo, tendo em conta que a fermentação não é um processo instantâneo. Posteriormente estudou-se o processo contínuo num fermentador de leito fluidizado com reciclo e por fim realizou-se um pré-estudo de viabilidade económica do processo contínuo.

Neste trabalho apresenta-se no capítulo 2 uma revisão bibliográfica onde são expostas algumas considerações relevantes para o desenvolvimento do mesmo, nomeadamente os aspectos relativos à levedura, sistemas de imobilização, cinética enzimática, processos de fermentação e reactores biológicos. No capítulo 3 são descritos os materiais e métodos utilizados nos ensaios experimentais realizados, seguindo-se o capítulo 4 onde são apresentados e discutidos os resultados obtidos experimentalmente e um pré-estudo de viabilidade do processo contínuo do ponto de vista económico. As conclusões do estudo em causa são apresentadas no capítulo 5 juntamente com propostas para trabalhos futuros. Por último, em anexo, apresentam-se todos os dados obtidos experimentalmente.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 LEVEDURAS

#### 2.1.1 Características Gerais

As leveduras são microrganismos unicelulares que pertencem ao grupo dos fungos. Estes microrganismos podem apresentar formas esféricas, ovais ou cilíndricas e o seu tamanho varia entre 5 a 30  $\mu\text{m}$  (García, 2004; Peynaud e Spencer 1984).

Como a maioria dos seres vivos as leveduras são seres heterotróficos, o que significa que não possuem a capacidade de produzir o seu próprio alimento a partir de substâncias simples como dióxido de carbono, necessitando então de compostos carbonados para obter a energia necessária à sua sobrevivência (García, 2004).

A principal fonte de energia utilizada pelas leveduras são os açúcares que podem ser metabolizados de forma aeróbia (respiração) ou anaeróbica (fermentação). Na presença de oxigénio a levedura utiliza a respiração para converter açúcares em dióxido de carbono, água e biomassa. Na ausência de oxigénio os açúcares são fermentados produzindo maioritariamente etanol e dióxido de carbono (Boulton *et al.*, 1999; García, 2004). Contudo, nem todos os tipos de levedura apresentam capacidade fermentativa. Assim, leveduras do género *Kluyveromyces* e *Saccharomyces* apresentam elevada capacidade de fermentação de açúcares, enquanto que o género *Rhodotorula* degrada a glucose exclusivamente por respiração (Deák, 2007).

Actualmente as leveduras são utilizadas em inúmeras áreas tais como a indústria dos alimentos, bebidas, biocombustíveis, produtos químicos, enzimas industriais, indústria farmacêutica e ainda no sector ambiental para tratamento de águas residuais. No entanto perspectiva-se que continuarão a ser os sectores tradicionais de produção de etanol (bebidas alcoólicas e combustíveis) e a indústria alimentar os principais responsáveis pelo fornecimento da maior quantidade dos produtos fermentados a nível mundial (Pretorius *et al.*, 2003).

De entre as leveduras de maior interesse a nível industrial, destaca-se a levedura do género *Saccharomyces*. Este género engloba uma grande variedade de espécies, sendo a



*Saccharomyces cerevisiae* a que tem despertado maior interesse na produção de vinho, pois é o principal microorganismo responsável pelo processo de fermentação alcoólica (Spencer-Martins e Sá-Nogueira, 2003).

O interesse demonstrado por este microorganismo deve-se à combinação de várias propriedades tais como um crescimento rápido, elevada capacidade de metabolização dos açúcares (glucose e frutose) e de produção de etanol, elevada tolerância a níveis baixos de oxigénio, resistência a concentrações elevadas de etanol e resistência ao pH do meio numa gama larga entre 3 e 7,5 (Jackson, 2008; Zimmermann e Entian, 1997).

A importância económica dos processos biotecnológicos que envolvem a levedura *Saccharomyces cerevisiae* contribuiu para o conhecimento aprofundado do seu metabolismo sendo a levedura mais estudada (Zimmermann e Entian, 1997; Pretorius *et al.*, 2003).

### 2.1.2 Imobilização de Biocatalisadores

Biocatalisadores (enzimas ou células) imobilizados são “catalisadores cuja mobilidade é fisicamente restrita a uma região definida do espaço, mantendo a sua actividade catalítica e a sua estabilidade, de forma a permitir a sua utilização por períodos repetidos ou continuados” (Fernandes *et al.*, 2003).

A tecnologia de imobilização é aplicada à escala industrial em diversas áreas tais como na produção de antibióticos, produção de compostos orgânicos por exemplo álcoois e ácidos, no sector ambiental no tratamento de águas residuais nomeadamente na desnitrificação e remoção de metais pesados, no desenvolvimento de biossensores e até mesmo em técnicas de inseminação artificial de animais, entre outras aplicações (Nedovic e Willaert, 2005).

Nos últimos anos tem havido um acrescido interesse nos sistemas imobilizados, nomeadamente na indústria vinícola, devido às vantagens técnicas e económicas comparativamente com o sistema convencional de células livres. Na Tabela 1 são apresentadas algumas das vantagens e desvantagens mais significativas da utilização de sistemas imobilizados, sendo a informação recolhida de diferentes fontes bibliográficas, nomeadamente Fernandes *et al.* (2003), Nedovic e Willaert (2005), Shuler e Kargi (2002).

**Tabela 1:** Vantagens e desvantagens da utilização de sistemas de biocatalisadores imobilizados.

Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Elevada concentração celular que resulta num aumento de produtividade</li> <li>- Possibilidade de reutilização da biomassa</li> <li>- Facilidade de recuperação das células diminuindo custos operacionais</li> <li>- Maior resistência a perturbações no meio fermentativo</li> <li>- Menor risco de contaminação do produto</li> <li>- Menor volume dos biorreactores o que resulta em menor investimento de capital</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Limitações difusionais à transferência de massa de produtos e substratos</li> <li>- Limitações das funções metabólicas devido à elevada densidade celular</li> <li>- Possível diminuição da viabilidade celular devido à matriz de imobilização</li> <li>- Diminuição da actividade catalítica durante a etapa de imobilização</li> </ul>

Fonte: Fernandes *et al.* (2003), Nedovic e Willaert (2005), Shuler e Kargi (2002)

Uma das principais questões a ter em conta nos sistemas imobilizados é o tipo de suporte a utilizar e as suas características. Existem diversos factores a ter em conta na selecção de um suporte consoante o tipo de aplicação que lhe é destinado. Os suportes podem ser classificados consoante a sua composição química ou a sua morfologia. Do ponto de vista da composição química os suportes são classificados como orgânicos ou inorgânicos, podendo ser naturais ou sintéticos. Consoante esta classificação, factores como a existência de grupos funcionais reactivos, resistência química, mecânica e biológica, geometria, custo e disponibilidade são relevantes na escolha do suporte. Morfologicamente, os suportes são classificados como porosos ou não porosos, sendo factores importantes na selecção do suporte a área superficial, as restrições difusionais, a carga máxima de biocatalisador que pode ser suportada, a protecção que o suporte pode oferecer ao biocatalisador face às condições adversas do meio, a sua compatibilidade com os substratos e o custo (Aires-Barros e Fernandes, 2003).

No que diz respeito à indústria do vinho, determinados requisitos devem ser satisfeitos de modo a tornar os suportes de imobilização atractivos, tais como o custo reduzido, fácil utilização, armazenamento de longa duração, reduzido risco de

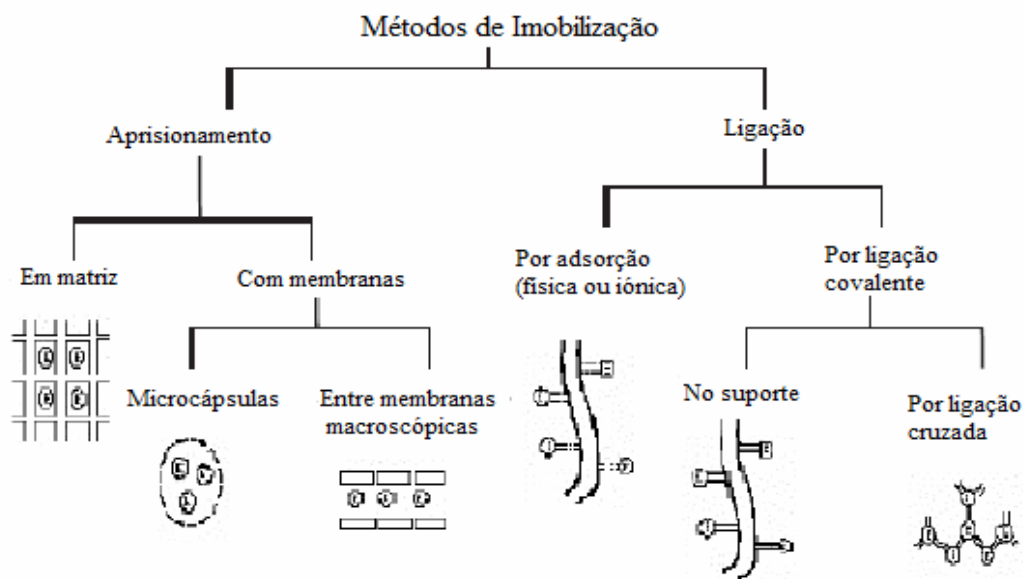
contaminação e não causar oxidação do vinho (Kourkoutas *et al.*, 2005; Nedovic e Willaert, 2005; Sipsas *et al.*, 2009). Estes requisitos têm levado ao desenvolvimento de estudos no sentido de determinar quais os materiais de suporte mais adequados. Desta forma vários suportes de imobilização têm sido propostos para a produção de vinho, como por exemplo os alginatos, kissiris (mineral de origem vulcânica),  $\gamma$ -alumina (Bakoyianis *et al.*, 1997), glúten (Sipsas *et al.*, 2009) e materiais celulósicos deslenhificados (Loukatos *et al.*, 2003).

Contudo, apesar de inúmeros suportes de imobilização serem propostos para a produção de vinho, a aplicação desta tecnologia a nível industrial ainda não é comum (Kourkoutas *et al.*, 2005; Sipsas *et al.*, 2009).

### **Métodos de Imobilização**

Os métodos de imobilização de biocatalisadores dividem-se essencialmente em dois grandes grupos: o aprisionamento físico e a imobilização por ligação. A imobilização por aprisionamento é um método físico em que as células são confinadas a um pequeno espaço limitado, destacando-se o aprisionamento com membranas e o aprisionamento em matrizes porosas. A imobilização por ligação abrange essencialmente dois métodos sendo o primeiro a adsorção física ou iónica que consiste na retenção do biocatalisador à superfície de um sólido e o segundo a imobilização por ligações covalentes que se estabelecem entre o biocatalisador e um suporte ou por ligações cruzadas entre os próprios biocatalisadores. (Shuler e Kargi, 2002). Na Figura 1 estão esquematizados os métodos mais usuais para imobilização de biocatalisadores.

A imobilização por aprisionamento em matrizes porosas é um dos métodos mais utilizados para imobilização de células. Normalmente são utilizados materiais poliméricos para a formação das matrizes que se mostram ser adequados na protecção das células relativamente a condições adversas como o pH, temperatura e possíveis compostos inibidores da actividade celular presentes no meio de fermentação. Este método apresenta algumas desvantagens tais como o pequeno volume disponível para uma elevada concentração celular, a possibilidade de crescimento de células e libertação para o meio de fermentação e a instabilidade de alguns suportes utilizados que limita a sua utilização prolongada (Shuler e Kargi, 2002).



**Figura 1:** Métodos de imobilização de biocatalisadores (adaptado de Dalla-Vicchia *et al.*, 2004).

No aprisionamento com membranas semipermeáveis para a retenção de células normalmente utilizam-se materiais como nylon, celulose e poliacrilato e existem diferentes configurações geométricas possíveis tais como fibras ocas e microcápsulas (Shuler e Kargi, 2002).

Os sistemas imobilizados obtidos por qualquer um dos métodos de aprisionamento originam limitações difusionais à transferência de massa de produtos e substratos. A configuração do sistema de imobilização torna-se assim um factor importante preferindo-se configurações que maximizem a área superficial. No caso de aprisionamento em matrizes porosas e com membranas do tipo microcápsulas a geometria esférica é preferível, já que esta estrutura apresenta uma elevada área superficial. A diminuição do tamanho das partículas facilita também a difusão interna.

Nos métodos de imobilização por ligação destacam-se os métodos que envolvem a adsorção a superfícies sólidas por ligações fracas como forças de van der Waals. No entanto estes métodos são pouco vantajosos quando usados em processos fortemente hidrodinâmicos pois estas ligações podem ser quebradas. Normalmente são utilizados como suporte materiais inorgânicos tais como alumina, sílica, cerâmicas e bentonite ou

materiais orgânicos tais como a celulose, carvão activado e resinas de permuta iónica (Shuler e Kargi, 2002). É ainda possível o método de imobilização por ligação covalente do catalisador à superfície de suportes de imobilização (método mais utilizado na imobilização de enzimas) ou por floculação celular (também designado por auto-agregação) que pode ocorrer de forma natural ou induzida. A floculação, embora vantajosa por dispensar a necessidade de utilização de suportes, apresenta como desvantagem a fraca capacidade de auto-agregação e a instabilidade dos agregados celulares naturais, recorrendo-se por isso à adição de agentes químicos que promovem a formação e estabilização desses agregados ou flocos (Shuler e Kargi, 2002).

### **Tipos de Suporte**

Existe uma grande diversidade de materiais que podem ser utilizados como suportes de imobilização de biocatalisadores, destacando-se materiais como o mineral kissiris (Bakoyianis e Koutinas, 1996; Bakoyianis *et al.*, 1997; Loukatos, 2003),  $\gamma$ -alumina (Bakoyianis e Koutinas, 1996; Bakoyianis *et al.*, 1997), glúten (Sipsas *et al.*, 2009) e até mesmo espumas de poliuretano (Baptista, 2007) que têm sido alvo de estudos como material de suporte para biocatalisadores, apresentando uma boa viabilidade em processos fermentativos. Kourkoutas *et al.* (2005), referem a utilização de pedaços de maçã, pêra e marmelo como suporte de imobilização de células *Saccharomyces cerevisiae* em processos de fermentação para a produção de vinho, no entanto este tipo de suporte confere um gosto afrutado ao vinho sendo, por isso, mais adequado para a produção de vinhos brancos.

Alguns autores consideram os suportes de alginato demasiadamente frágeis, por se tratarem de géis e, por isso, pouco adequados para utilização em biorreactores de elevada capacidade, devido ao efeito da pressão exercido na base do reactor que pode provocar o rompimento das esferas. Para além deste factor, referem também que são pouco favoráveis à preservação de células imobilizadas (Loukatos *et al.*, 2003). Por outro lado, alguns dos estudos realizados, referem o uso de suportes de alginato, como sendo mais eficientes do ponto de vista da produtividade relativamente a outro tipo de suportes, e mais vantajosos devido às suas características que os tornam não tóxicos e, por isso, compatíveis com as condições de pureza alimentar exigidas (Bakoyianis *et al.*, 1997).

Em resposta aos problemas associados à falta de resistência dos suportes de alginato, foram desenvolvidas técnicas de imobilização em camada dupla de alginato. Esta técnica utilizada pela Proenol – Indústria de Biotecnologia, apresenta resultados favoráveis quer do ponto de vista da resistência do material de imobilização quer do ponto de vista da preservação celular havendo estudos à escala laboratorial e industrial para a fermentação maloláctica (Silva *et al.*, 2003).

### **2.1.3 Limitações à Transferência de Massa em Sistemas Imobilizados**

Quando se trabalha com sistemas imobilizados, particularmente em sistemas de aprisionamento, é necessário ter atenção às limitações difusionais associadas à transferência de massa de substratos e de produtos. Dado que as células se encontram de alguma forma aprisionadas, a transferência de massa entre o meio líquido e o biocatalisador está sujeita a resistências impostas pela imobilização.

No que diz respeito ao transporte de nutrientes e produtos, a difusão é o mecanismo predominante. Em sistemas imobilizados, há uma competição entre os fenómenos de difusão e de reacção. Quando as limitações à transferência de massa são elevadas, a difusão é mais lenta do que a reacção e o sistema diz-se controlado por difusão. Se, por outro lado, a reacção é o passo limitante, o processo é controlado pela reacção e as limitações difusionais são reduzidas (Ferreira e Teixeira, 2003).

A transferência de massa entre o meio líquido e o biocatalisador imobilizado divide-se em duas fases:

- transferência de massa externa, que envolve a transferência de substrato do meio líquido até a superfície do suporte de imobilização e,
- transferência de massa interna, que se caracteriza pelo fluxo do substrato no interior do suporte ou agregado de imobilização.

No que respeita a biocatalisadores imobilizados em matrizes porosas, como é o caso de esferas de alginato, as limitações à transferência de massa interna têm uma importância acrescida relativamente a outros métodos de imobilização uma vez que o

substrato tem de se difundir através dos poros de forma a atingir o biocatalisador, podendo-se minimizar este efeito reduzindo o tamanho das partículas de imobilização.

Admitindo que se possam desprezar as limitações à transferência de massa interna, é necessário minimizar o mais possível os efeitos difusionais externos de forma a garantir um processo maioritariamente controlado pela reacção. Os principais factores que estão directamente relacionados com a transferência de massa externa são o tipo de reactor e o sistema de imobilização, já que estes influenciam directamente o coeficiente de transferência de massa do filme líquido que envolve os biocatalisadores imobilizados (Carvalho *et al*, 2006). Assim, a agitação do meio líquido, que pode ser imposta por agitação mecânica, pneumaticamente ou por circulação forçada por sistemas de bombagem, é tida como um factor de elevada importância no que diz respeito à transferência de massa. Uma elevada eficiência de mistura maximiza o contacto superficial entre as fases, o que resulta na diminuição da espessura do filme líquido e consequente diminuição das limitações difusionais externas (Ferreira e Teixeira, 2003).

#### 2.1.4 Cinética de Michaelis-Menten

O modelo matemático mais utilizado para descrever o consumo de substratos em processos que envolvem reacções catalisadas por enzimas, é a cinética de Michaelis-Menten, descrita pela equação 1 (Shuler e Kargi, 2002). Este modelo foi desenvolvido segundo algumas hipóteses sendo por isso utilizado para descrever processos simples. Pressupõe a utilização de um único substrato, assume que a concentração de enzima é constante (já que esta não é consumida durante a reacção), o complexo enzima-substrato é rapidamente estabelecido, a reacção de formação de produtos é irreversível e que não existem inibições impostas pelo substrato ou pelo produto (Shuler e Kargi, 2002).

$$r = r_{\max} \frac{S}{K_m + S} \quad \text{com} \quad r_{\max} = k[E]_t \quad (1)$$

onde  $r$  representa a velocidade de reacção (g/L.h) ,  $r_{\max}$  a velocidade máxima de reacção (g/L.h),  $S$  a concentração de substrato (g/L),  $K_m$  a constante de Michaelis-Menten (g/L),  $[E]_t$  a concentração total de enzima (g/L) e  $k$  a constante cinética ( $\text{h}^{-1}$ ).

Quando  $K_m \ll S$  a equação de Michaelis-Menten aproxima-se a uma cinética de ordem zero (equação 2), sendo independente da concentração de substrato.

$$r = r_{\max} \frac{S}{K_m + S} \xrightarrow{K_m \ll S} r = r_{\max} \quad (2)$$

Por outro lado, se  $K_m \gg S$  a equação de Michaelis-Menten aproxima-se a uma reacção de primeira ordem (equação 3), desta forma a velocidade de reacção depende linearmente da concentração de substrato.

$$r = r_{\max} \frac{S}{K_m + S} \xrightarrow{K_m \gg S} r = \frac{r_{\max}}{K_m} S \quad (3)$$

Por ser um modelo específico para reacções catalisadas por enzimas, a equação de Michaelis-Menten é válida para processos que envolvem biocatalisadores enzimáticos tais como as leveduras, já que estes realizam as suas funções metabólicas através de enzimas. Embora a cinética de Michaelis-Menten possa ser utilizada para descrever processos que envolvem biocatalisadores, é necessário ter em conta que as leveduras utilizam o substrato quer para a manutenção celular quer para a reprodução, o que se traduz no aumentando a concentração de levedura e consequentemente de enzima no meio. Deste modo é necessário considerar simultaneamente ao modelo cinético modelos de crescimento celular para descrever o consumo de substrato. Quando os biocatalisadores se encontram imobilizados em matrizes ou com membranas, o crescimento celular é restrito e portanto a concentração de enzima mantém-se constante, podendo-se assumir válida a equação de Michaelis-Menten para descrever a cinética destes processos, negligenciando o crescimento celular.

#### **- Determinação dos Parâmetros Cinéticos de Michaelis-Menten**

Um dos métodos mais usuais para descrever a cinética de uma reacção consiste no método das velocidades iniciais. Este método é vulgarmente utilizado para determinar os parâmetros  $K_m$  e  $V_{\max}$  da equação de Michaelis-Menten pela determinação da velocidade inicial de reacção para diferentes concentrações iniciais de substrato. Desta forma é



possível determinar os parâmetros  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  a partir de vários métodos gráficos tais como o método de Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee e Heanes-Woolf (Fogler, 1999; Shuler e Kargi, 2002).

Em determinadas condições pode não ser viável medir-se velocidades iniciais. Assim, uma forma de determinar estes parâmetros passa pela aplicação do método integral, utilizando a forma integrada da equação de Michelis-Menten, descrita pela equação 4 (Shuler e Kargi, 2002).

$$t = -\frac{K_m}{r_{max}} \ln \frac{S}{S_0} + \frac{(S_0 - S)}{r_{max}} \quad (4)$$

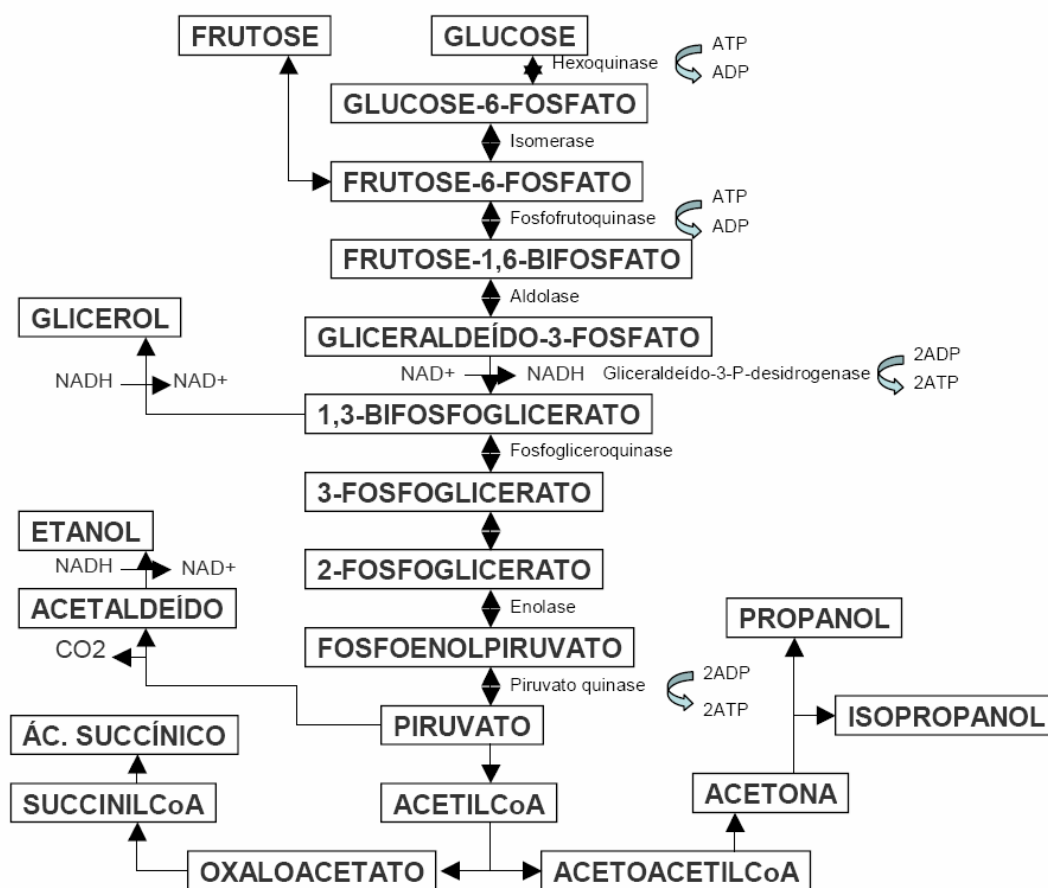
onde  $S_0$  representa a velocidade inicial de consumo de substrato (g/L).

Os parâmetros  $K_m$  e  $r_{max}$  podem fornecer informações importantes acerca do comportamento da enzima.  $K_m$  é uma constante que define a afinidade entre a enzima e o substrato e quanto maior é o seu valor menor é a afinidade da enzima pelo substrato. A velocidade máxima de reacção,  $r_{max}$ , é directamente proporcional à concentração de enzima pelo que aumenta com o aumento da concentração de enzima e o seu valor não é alterado pela concentração de substrato. Conhecidos estes parâmetros é possível determinar a velocidade da reacção (Shuler e Kargi, 2002).

## 2.2 PROCESSO FERMENTATIVO

### 2.2.1 Bioquímica da Fermentação

Como referido anteriormente, o principal microorganismo usado no processo de fermentação alcoólica é a levedura do género *Saccharomyces*. Esta levedura com baixos níveis de oxigénio metaboliza os principais açúcares presentes no mosto (glucose e frutose) dando origem a etanol e dióxido de carbono através de uma série de reacções sequenciais (Figura 2), cada uma catalisada por uma enzima específica presente na levedura.



**Figura 2:** Via de metabolização dos açúcares pela levedura (Carvalho, 2007).

Sumariamente, a levedura metaboliza os açúcares (glucose e frutose) a piruvato por via glicolítica (Embden-Meyerhof), o piruvato é descarboxilado originando acetaldéido que é então reduzido a etanol. Neste processo, cada molécula de glucose (ou frutose) origina uma molécula de etanol e uma de dióxido de carbono, produzindo-se ainda uma pequena quantidade de biomassa e de outros subprodutos como álcoois superiores, glicerol, cetonas, aldeídos, ácidos gordos acetatos e ésteres (Boulton *et al.*, 1999; Jackson, 2008). Simultaneamente gera-se energia sob a forma de ATP que é utilizada pela levedura na manutenção celular, crescimento e reprodução. Esta energia pode ser gerada quer pelo processo respiratório quer por fermentação. Contudo há uma maior tendência para o metabolismo por via fermentativa mesmo na presença de oxigénio. Apenas em situações de escassez de açúcares é que se verifica a utilização da respiração como via metabólica (Boulton *et al.*, 1999). Embora a levedura produza etanol, CO<sub>2</sub> e outros produtos como resultado do seu metabolismo, estes compostos não têm utilidade metabólica podendo, em

situações de escassez de nutrientes, ser utilizados para a produção de ATP e para a manutenção celular (Boulton *et al.*, 1999; Nielson e Villadsen, 1994).

Embora o mecanismo de fermentação seja aparentemente simples, dependendo das condições experimentais podem ocorrer outras vias metabólicas com formação de produtos necessários à produção de biomassa (polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos) ou relacionados com a adaptação e sobrevivência do microorganismo (como o glicerol, o ácido succínico e o ácido acético), podendo estes produtos inibir a formação de etanol (Boulton *et al.*, 1999; Guimarães, 2005).

### 2.2.2 Factores que Afectam o Desempenho Fermentativo

A fermentação alcoólica é um processo que depende de diversos factores para além do tipo de levedura utilizada. Entre estes factores destacam-se a temperatura, a taxa de oxigénio, o pH e a natureza química dos nutrientes (Macedo *et al.*, 2003).

As leveduras apresentam uma baixa tolerância a temperaturas extremas. De facto, há uma temperatura óptima ( $T_{op}$ ) que maximiza a actividade da levedura e para temperaturas acima ou abaixo desta o seu desempenho é limitado. Além disso apresentam uma temperatura máxima ( $T_{max}$ ) que corresponde à temperatura mais elevada à qual se detecta crescimento da população. Esta temperatura permite a classificação termobiológica dos microorganismos em psicrófilos se  $T_{max} \leq 25^{\circ}\text{C}$ , mesófilos se  $25^{\circ}\text{C} < T_{max} < 50^{\circ}\text{C}$  ou termófilos se  $T_{max} \geq 50^{\circ}\text{C}$  (Fonseca e Madeira-Lopes, 2003). Além de afectar a actividade fermentativa a temperatura também pode ser responsável pela formação de produtos secundários, como ácido acético e succínico, em quantidades indesejáveis (Peynaud e Spencer, 1984).

Outro factor com elevada influência na fermentação é o pH do meio, sendo que o valor óptimo para a maioria das leveduras varia entre 3 a 6. Embora o pH não afecte directamente a capacidade fermentativa das leveduras, afecta a sua capacidade de reprodução e por isso, de forma indirecta, afecta a fermentação (Jackson, 2008).

O fornecimento e controlo de oxigénio são parâmetros de elevada importância mesmo para sistemas anaeróbios. Com efeito, embora a principal forma de geração de energia nestes sistemas seja a fermentação, o oxigénio é sempre necessário para a

manutenção da viabilidade celular em casos de baixa concentração de substrato. Sem o fornecimento de oxigénio os microorganismos não conseguem reproduzir-se, o que faz com que a limitação por oxigénio possa funcionar como método de controlo da flora microbiana, ao condicionar a taxa de crescimento celular dos microorganismos e assim controlar o processo de fermentação (Macedo *et al.*, 2003).

Finalmente, o tipo de nutrientes presentes no mosto é também um factor de elevada importância para a fermentação já que, na fase de crescimento exponencial, a multiplicação celular pode ser limitada pela escassez de substrato, entrando precocemente em crescimento estacionário, podendo provocar o início da fase de morte dos microorganismos levando ao termo do processo de fermentação (Fonseca, 2007).

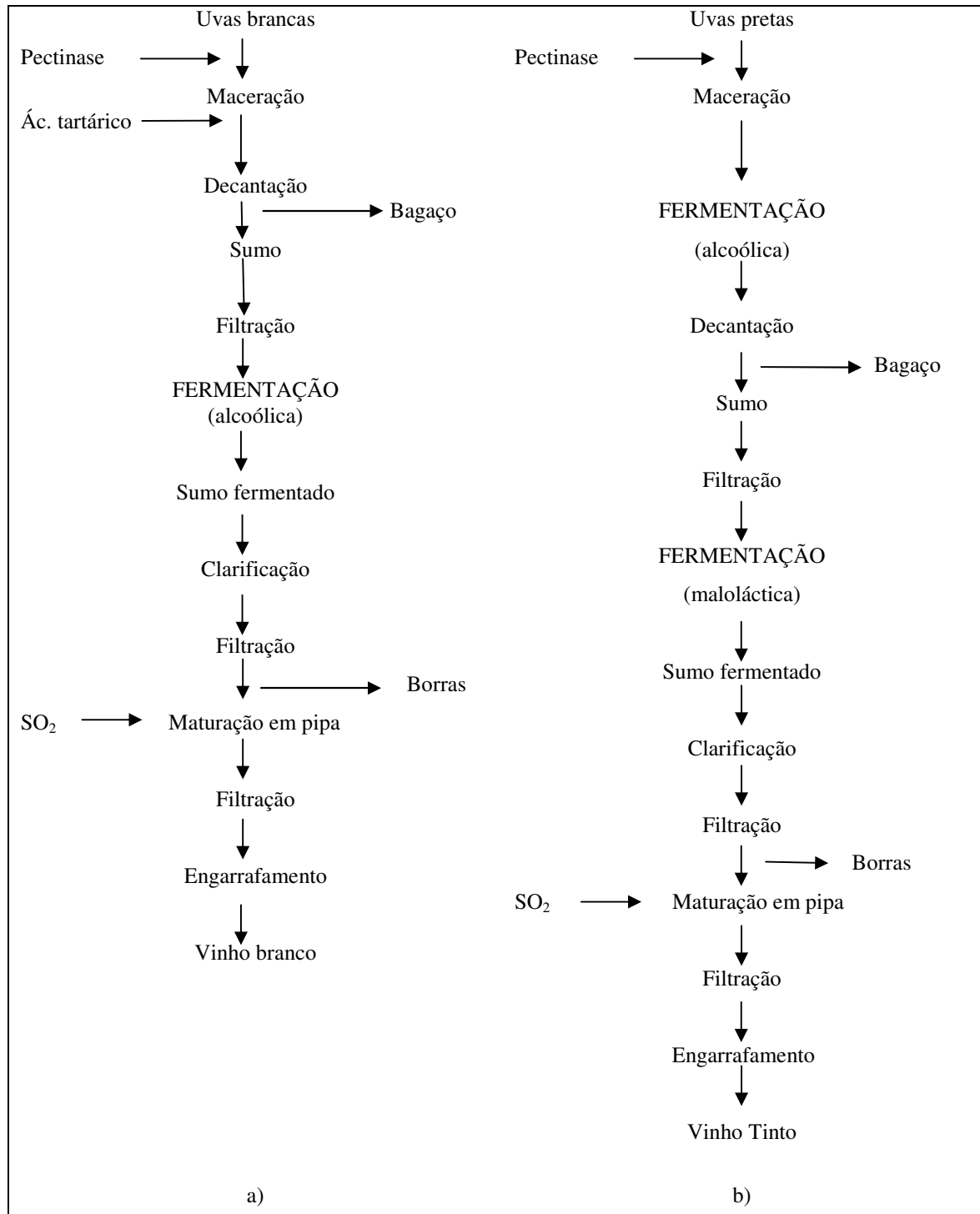
### **2.2.3 Produção de Vinho**

A qualidade dos vinhos tem vindo a aumentar ao longo dos anos devido a vários factores associados ao desenvolvimento tecnológico, como por exemplo o desenvolvimento de boas práticas de cultivo, a selecção de castas específicas de videiras e a selecção e adição de leveduras tendo em conta os conhecimentos da bioquímica e microbiologia do processo fermentativo, assim como o desenvolvimento e optimização de novos processos de fermentação.

A vinificação é o conjunto de operações necessárias para a elaboração de vinhos. De um modo geral, a produção de vinho segue um processo tradicional que, dependendo do tipo de vinho que se pretende produzir, apresenta pequenas variações. Assim, o processo de produção de vinho tinto apresenta algumas diferenças relativamente ao processo que se aplica para a elaboração de vinhos brancos (Macedo *et al.*, 2003; Boulton *et al.*, 1999), tal como se representa esquematicamente na Figura 3.

O processo de produção de vinho inicia-se com a colheita da uva. Esta fase caracteriza-se pelo acompanhamento dos teores de determinados componentes da uva, entre os quais os açúcares e os níveis de acidez, com o objectivo de determinar a melhor altura para a colheita. As uvas devem atingir um determinado estado de maturação de

forma a garantir um equilíbrio entre a concentração de ácido málico e tartárico, factor determinante para que estas se enquadrem nas condições exigidas de qualidade enológica (Boulton *et al.*, 1999).



**Figura 3:** Esquema do processo de fabrico de vinho a) branco e b) tinto (adaptado de Macedo *et al.*, 2003).

Após a colheita da uva segue-se o esmagamento cujo principal objectivo consiste em provocar o rebentamento da película da uva de forma a permitir a separação das fracções sólidas (sementes, polpa e pele) da fracção líquida (sumo) (Jackson, 2008). De seguida realiza-se um processo designado por maceração, que consiste na extracção de alguns componentes presentes nas fracções sólidas da uva. Estes compostos são determinantes para o aroma e sabor de determinados vinhos e são responsáveis pela coloração dos vinhos tintos. Assim, a maceração é indispensável no fabrico de vinhos tintos e opcional para os vinhos brancos (Jackson, 2008; Peynaud e Spencer, 1984).

O estado de maturação da uva na altura da colheita é determinante na composição do mosto obtido. Desta forma, são permitidas certas práticas de adição de determinados componentes ao mosto, caso este apresente desequilíbrios na sua composição. Práticas como a adição de agentes acidificantes (ácido tartárico) e desacidificantes (carbonato de cálcio ou bicarbonato de potássio) são aceites para regular os níveis de acidez, bem como a adição de dióxido de enxofre (sulfitação) que impede a oxidação e inibe o desenvolvimento de bactérias (Cardoso, 2007).

No método tradicional de produção de vinho as leveduras presentes na casca da uva realizam a fermentação alcoólica de forma espontânea, sendo o produto final resultado de uma combinação da acção de variadas espécies de leveduras, das quais as mais resistentes ao etanol predominam nos estágios finais da fermentação. Assim, no início da fermentação, as leveduras do género *Kloeckera* são predominantes, passando por *Hansenula* e nos estágios finais praticamente só se encontram leveduras do género *Saccharomyces*. Tal variedade de microorganismos conduz a um início lento da fermentação e à obtenção de um produto final com características pouco uniformes (Macedo *et al.*, 2003; Fleet e Bonnett, 1993).

Os desenvolvimentos da biotecnologia permitiram a selecção e adição controlada de culturas puras, designadas por culturas de arranque, em processos de vinificação de modo a minimizar a influência das leveduras naturais na qualidade final do vinho. A utilização desta técnica permite a produção de vinhos de melhor qualidade ao interferir com determinados factores tais como reduzir o tempo de fermentação, utilizar microorganismos mais resistentes ao etanol e à temperatura de operação, prevenir a

formação de componentes indesejáveis que interfiram com o aroma e o sabor do vinho e aumentar a tolerância ao SO<sub>2</sub> (Boulton *et al.*, 1999). Deste modo a vinificação é mais controlada sendo a qualidade dos vinhos menos flutuante de ano para ano.

A fermentação é uma etapa fundamental na produção de vinho, pois é a partir deste processo que as leveduras transformam os açúcares presentes no mosto nos produtos finais desejados, sendo a fermentação alcoólica o principal processo fermentativo associado à produção de vinho.

A fermentação alcoólica é um processo microbiológico anaeróbio que se caracteriza pela conversão da glucose e frutose (principais açúcares presentes no mosto) em etanol e dióxido de carbono. O principal microorganismo responsável pela fermentação alcoólica em processos de vinificação é a levedura do género *Saccharomyces* que devido às suas características apresenta uma boa adaptação ao meio de fermentação e elevada tolerância ao álcool entre outros factores referidos no ponto 2.1.1 (Jackson, 2008).

A temperatura mais adequada para a realização da fermentação alcoólica dos vinhos brancos difere da aplicada no fabrico de vinhos tintos. Na produção dos vinhos tintos realiza-se um processo de maceração que necessita de temperaturas elevadas. Por esta razão a fermentação alcoólica na produção de vinho tinto é realizada entre os 25 - 30 °C, enquanto que na produção dos vinhos brancos a temperatura de fermentação ronda os 18 - 23 °C. Acima dos 32 - 35 °C as leveduras usuais para a fermentação de mosto morrem pelo que o risco de termo da fermentação é elevado para temperaturas desta ordem (Fleet e Bonnett, 1993; Jackson, 2008; Peynaud e Spencer, 1984).

No caso dos vinhos tintos após a fermentação alcoólica realiza-se ainda a fermentação maloláctica que consiste na conversão do ácido málico em ácido láctico e dióxido de carbono, por um processo de descarboxilação. Os principais microorganismos responsáveis por este processo são bactérias lácticas do género *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Pediococcus* (Macedo *et al.*, 2003). A fermentação maloláctica tem como principal objectivo a redução da acidez do vinho contribuindo para a sua estabilidade microbiológica e alterações favoráveis ao seu paladar tornando-o mais macio e complexo (Macedo *et al.*, 2003; Nedovic e Willaert, 2005).

#### 2.2.4 Reactores Biológicos

Os reactores biológicos, também designados por biorreactores, são “as unidades processuais onde ocorre a reacção biológica, sendo, por isso, elementos fundamentais em qualquer processo biotecnológico” (Teixeira *et al.*, 2007).

Os reactores utilizados na indústria apresentam três modos de operação distintos: descontínuo (ou batch), contínuo e semi-contínuo. A operação em descontínuo caracteriza-se pela adição de todos os nutrientes ao meio de fermentação no início do processo e na recolha dos produtos formados no final da fermentação. Nas operações em contínuo, os nutrientes são alimentados continuamente e o produto formado é recolhido ao mesmo caudal de alimentação, mantendo-se constante o volume de líquido no biorreactor. Os reactores semi-contínuos apresentam um compromisso entre os outros dois modos de operação referidos, sendo a alimentação efectuada ao longo do processo e a recolha de produtos apenas no final da fermentação (Teixeira *et al.*, 2007). A Tabela 2 apresenta as vantagens e desvantagens associadas a cada tipo de reactor, informação retirada de diferentes fontes bibliográficas, nomeadamente Teixeira *et al.* (2007), Nielsen e Villadsen (1994).

Apesar do processo de fermentação em modo contínuo ser utilizado em muitos processos químicos industriais, tal não se verifica no que diz respeito à indústria do vinho, onde a maioria dos fermentadores utilizados são descontínuos (Koutinas *et al.*, 1997), embora haja referência à produção contínua de vinho de baixa qualidade (Lothar, 1999). Alguns estudos têm sido desenvolvidos no sentido de comprovar as vantagens da aplicabilidade de processos em contínuo na produção de vinho (Bakoyianis *et al.*, 1997; Gilson e Thomas, 1995; Loukatos *et al.*, 2003; Sipsas *et al.*, 2009; Takaya *et al.*, 2002).

Independentemente do modo de operação, existe uma grande diversidade de biorreactores no que diz respeito à forma, tamanho e configuração, salientando-se das possíveis configurações mais comuns o tanque agitado e os reactores de coluna entre os quais o leito fixo, leito fluidizado, coluna de bolhas e circulação induzida por arejamento (*air lift*) (Teixeira *et al.*, 2007).



**Tabela 2:** Vantagens e desvantagens dos diferentes tipos de operação de reactores.

Tipo de operação	Vantagens	Desvantagens
Descontínuo	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Versatilidade de utilização;</li> <li>- Fácil operação e controlo;</li> <li>- Baixo risco de contaminação;</li> <li>- Possibilidade de conversão completa do substrato.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Elevados custos de operação;</li> <li>- Tempo de preparação entre utilizações elevado;</li> <li>- Menor produtividade.</li> </ul>
Contínuo	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Baixos custos de operação;</li> <li>- Elevada produtividade;</li> <li>- Fácil automatização;</li> <li>- Facilidade de controlo de qualidade dos produtos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Maior risco de contaminação;</li> <li>- Possibilidade de mutação espontânea dos microorganismos;</li> <li>- Inflexível: raramente pode ser utilizado para outras produções senão aquela para a que foi projectado.</li> </ul>
Semi-contínuo	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Combinação das vantagens do modo descontínuo e contínuo;</li> <li>- Ideal para processos com inibição pelo substrato.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Maior necessidade de controlo do processo (adição de substrato).</li> </ul>

Fonte: Teixeira *et al.* (2007), Nielsen e Villadsen (1994)

Nos processos que envolvem células imobilizadas são várias as configurações de reactores utilizados, sendo os reactores do tipo coluna mais usuais para o caso em que o suporte mostra ser de natureza frágil. De entre estes, os reactores de leito fixo são os mais utilizados com sistemas de células imobilizadas e caracterizam-se pela circulação de substrato em torno de um leito que contém os biocatalisadores imobilizados (Teixeira *et al.*, 2007). Embora sejam de funcionamento relativamente simples, não são adequados para sistemas que exijam uma boa eficiência de transferência de massa gás-líquido, porque as limitações difusionais são elevadas devido à baixa velocidade de circulação do fluido. A produção de CO<sub>2</sub> em grandes quantidades é outro factor a ter em conta. Devido ao empacotamento do leito a sua remoção torna-se difícil, podendo levar ao arrastamento do biocatalisador para o topo da coluna e conseqüentemente causar sérias dificuldades operacionais (Ramakrishna e Prakasham, 1999).

Na tentativa de contornar os problemas associados aos reactores de leito fixo, surgem os reactores de leito fluidizado onde a fluidização pode ser imposta pela passagem de líquido, de gás ou ainda de uma mistura dos dois. A fluidização do meio melhora as condições de transferência de massa bem como a remoção de gases como por exemplo o dióxido de carbono. Para se obterem boas características de fluidização a diferença de densidade entre os sistemas de células imobilizadas e o meio de fermentação deve ser suficiente para que não ocorra o arraste das partículas, de modo a permitir velocidades de circulação do fluido elevadas. Por este motivo muitos autores, referem que os géis de hidrocolóides hidratados, tais como os alginatos, não são recomendados devido à semelhança de densidades entre o polímero e o meio de fermentação aquoso (Kourkoutas *et al*, 2005; Loukatos *et al*, 2003). Contudo, outros estudos efectuados em leito fluidizado com esferas de alginato como suporte de imobilização de células não referem problemas desta natureza (Gilson e Thomas, 1995).

Os reactores de tanque agitado são o tipo de reactor mais utilizado com sistemas de células livres. Só são utilizados para sistemas de imobilização com elevada resistência física, já que neste tipo de reactores determinadas condições de agitação podem levar à degradação do suporte de imobilização (Shuler e Kargi, 2002). A Tabela 3 apresenta as vantagens e desvantagens dos reactores de tanque agitado e de coluna (leito fixo e leito fluidizado), informação recolhida de diferentes fontes bibliográficas, nomeadamente Teixeira *et al*. (2007), Ferreira e Teixeira (2003), Nielsen e Villadsen (1994).

A finalidade básica da utilização de células imobilizadas em biorreactores é a manutenção de elevadas concentrações celulares no início da operação o que leva ao aumento da velocidade de reacção permitindo atingir elevadas produtividades. Permitem, também, a realização de fermentações em contínuo com elevadas taxas de diluição (sem o risco de “washout”) e reduzidos custos operacionais e de controlo comparativamente com as técnicas de fermentação tradicionais (McGee *et al*, 1982).

Vários estudos de engenharia têm sido desenvolvidos nos últimos anos no sentido de desenvolver, modificar e otimizar reactores com o objectivo de obter melhorias nos processos biotecnológicos (Takaia *et al*., 2002; Margaritis e Merchant, 1984 citados por Bakoyianis e Koutinas, 1996; Batista *et al*., 2006). Contudo, não se têm conseguido processos biotecnológicos economicamente viáveis quando comparados com os métodos tradicionais. Assim, a forte aposta da bioengenharia para o futuro, deve passar, não pelo

desenvolvimento de novos tipos de reactores, mas sim pelo desenvolvimento de processos economicamente viáveis.

**Tabela 3:** Vantagens e desvantagens dos diferentes tipos de biorreactores que operam com células imobilizadas.

Tipo de Biorreactor	Vantagens	Desvantagens
Tanque agitado	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fácil controlo de temperatura e pH;</li> <li>- Boas características de mistura;</li> <li>- Boas características de transferência de oxigénio.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Baixa produtividade;</li> <li>- Possibilidade de degradação do suporte de imobilização.</li> </ul>
Leito Fixo	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Simplicidade de design</li> <li>- Baixo custo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Baixa transferência de O<sub>2</sub> e nutrientes;</li> <li>- Alterações de fluxo (caminhos preferenciais);</li> <li>- Empacotamento do leito;</li> </ul>
Leito Fluidizado	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Área superficial elevada;</li> <li>- Boas características de mistura;</li> <li>- Limitações difusionais à transferência de massa e calor reduzidas;</li> <li>- Não ocorre empacotamento do leito;</li> <li>- Remoção de gases facilitada</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Scale-up complexo;</li> <li>- Pouco adequado para sistemas de imobilização com densidade próxima da do meio líquido.</li> </ul>

Fonte: Teixeira *et al.* (2007), Ferreira e Teixeira (2003), Nielsen e Villadsen (1994)

#### 2.2.4.1 Modo de Operação: Contínuo vs. Descontínuo

Os processos contínuos, por analogia com a indústria química, podem favorecer em muitos aspectos a indústria da fermentação por diversas razões, incluindo vantagens económicas devido à operação contínua por longos períodos. Estes sistemas podem alcançar melhorias substanciais na eficiência do processo e consequentemente obter produtividades mais elevadas com menores custos de operação (Sipsas *et al.*, 2009). O rendimento obtido nas operações em contínuo em condições de fermentação optimizadas e a composição do produto uniforme e constante são, também, factores vantajosos (Lothar,

1999). Na Tabela 4 são sumariadas algumas das condições de operação em processos de fermentação alcoólica com utilização de sistemas imobilizados.

Vários estudos relativos ao processo contínuo de fermentação alcoólica são referidos na literatura, contudo grande parte desses estudos estão direccionados para a produção industrial de etanol (Nguyen e Shieh, 1992; Bakoyianis e Koutinas, 1996; Gyamerah e Glover, 1996; Baptista *et al.*, 2007), sendo escassos os que dizem respeito à produção de vinho.

**Tabela 4:** Características de alguns processos de fermentação alcoólica estudados com levedura do género *Saccharomyces cerevisiae*.

Produto	Suporte de Imobilização	Modo de Operação	Configuração do Reactor	Temperatura de operação (°C)	Referência
Vinho	Alginato de cálcio	Contínuo	Leito fluidizado	30	Gilson e Thomas (1995)
	Kissiris, $\gamma$ -alumina e alginato de cálcio	Contínuo e batch	-	27, 13 e 7	Bakoyianis <i>et al.</i> (1997)
	-	Contínuo	CSTF* + Reactor de membrana	25	Takaya <i>et al.</i> (2002)
	Kissiris e DCM**	Contínuo	Leito fixo	Temperatura ambiente e baixa (16 °C)	Loukatos <i>et al.</i> (2003)
	Glúten	Contínuo e batch	MFBT***	(30, 20, 10 e 5)	Sipsas <i>et al.</i> (2009)
Etanol	Microcápsulas de Celite	Contínuo	Leito fluidizado	30	Nguyen e Shieh (1992)
	Algiato de cálcio	Contínuo	Tubular	30	Gyamerah e Glover (1995)
	Kissiris e $\gamma$ -alumina	Batch	Leito fixo	-	Bakoyianis e Koutinas (1996)
	Espuma de poliuretano	Contínuo	Leito fluidizado (fluxo descendente)	30	Baptista <i>et al.</i> (2007)

\* Continuous stirred tank fermentors

\*\* Delignified cellulosic materials

\*\*\* Multistage fixed-bed tower

Os estudos referentes ao processo contínuo de fermentação alcoólica na produção de vinho apresentados na literatura são realizados em condições bastante diversificadas, pelo que a sua comparação se torna difícil. Por este motivo, a exposição dos estudos realizados é apresentada individualmente. No entanto, um aspecto comum entre estes estudos é a levedura utilizada, *Saccharomyces cerevisiae* sendo a principal responsável pelo processo de fermentação alcoólica.

O desenvolvimento da tecnologia de produção de vinho em contínuo utilizando células imobilizadas não se tem destacado essencialmente devido a razões como a falta de material de suporte apropriado de baixo custo, qualidade indeterminada de sabor e aroma do vinho produzido e à baixa viabilidade dos sistemas imobilizados (Kourkoutas *et al.*, 2005), pelo que vários estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de resolver estas questões (Gilson e Thomas, 1995; Bakoyianis *et al.*, 1997; Loukatos *et al.*, 2003).

Gilson e Thomas (1995) estudaram a influência das condições de imobilização de leveduras em alginato na fermentação alcoólica, nomeadamente o diâmetro das esferas e a concentração de alginato. Utilizaram um reactor de leito fluidizado especialmente desenvolvido para diminuir os problemas associados à remoção de CO<sub>2</sub>, empacotamento do leito e ascensão de esferas flutuantes, apresentando fluxo ascendente e descendente em simultâneo e saída ao centro do fermentador. Em todos os ensaios, a operação decorreu por períodos superiores a 20 dias à temperatura de 30 °C. Constataram que o aumento do diâmetro das esferas, numa gama de 1-5 mm, resulta na diminuição do consumo de glucose e produção de etanol e diminui também a resistência das esferas. Concluíram que, para uma concentração de alginato entre 1-5% (w/w) na imobilização celular, o consumo de glucose e a produção de etanol não são significativamente influenciados. Este estudo comprova que as características do suporte de imobilização têm uma grande influência na fermentação.

Loukatos *et al.* (2003) desenvolveram estudos comparando a eficiência de três materiais de suporte distintos na produção de vinho em contínuo à escala laboratorial. Como materiais de suporte de imobilização de leveduras utilizaram kissiris, glúten e DCM. Utilizaram um reactor de leito fixo para os suportes kissiris e glúten e de leito fluidizado no

caso do suporte DCM. Comprovaram que este último material apresenta melhores resultados quer do ponto de vista da qualidade dos vinhos (aroma e sabor) quer das características associadas a sub-produtos indesejados, já que utilizando DCM como suporte a produção de compostos voláteis tóxicos é mais reduzida.

De forma a comprovar a viabilidade do processo contínuo à escala industrial, Loukatos *et al.* (2003) testaram um biorreactor de leito fixo com múltiplos estágios (MFBT) com capacidade de 11000 L, utilizando DCM como material de suporte e realizaram um estudo económico do processo de produção de vinho a baixa temperatura (16 °C). Para uma produção anual de 800000 L de vinho, obtiveram uma redução de custos de investimento de cerca de 20% e de custos de produção de 35%, relativamente ao processo tradicional com células livres, o que comprovou a viabilidade do processo em contínuo à escala industrial tanto do ponto de vista tecnológico como económico.

Estudos comparativos do processo batch com células livres, batch com células imobilizadas e o processo em contínuo foram desenvolvidos por Bakoyianis *et al.* (1997). A fermentação em descontínuo foi realizada à temperatura de 7 °C, 13 °C e 27 °C com 300 mL de mosto utilizando células livres e células imobilizadas em kissiris,  $\gamma$ -alumina e esferas de alginato, mantendo-se a mesma concentração celular em todos os casos. Os resultados demonstraram que a velocidade de fermentação quando se utilizam sistemas imobilizados foi 2 a 3 vezes superior do que com células livres nos processos descontínuos. Verificou-se também que a velocidade de fermentação diminui consoante os suportes de imobilização de acordo com a série alginato, kissiris e  $\gamma$ -alumina e que esta diferença aumenta com a diminuição da temperatura. A produtividade de etanol verificou-se ser superior quando utilizados sistemas de imobilização relativamente ao sistema de células livres, sendo 3 vezes superior no caso do alginato para todas as temperaturas estudadas.

O processo contínuo estudado por Bakoyianis *et al.* (1997) foi conduzido a temperaturas entre 27 °C e 7 °C. O processo iniciou-se à temperatura de 20 °C sendo gradualmente reduzida até 7 °C após se atingir o estado estacionário entre cada temperatura, tendo-se posteriormente aumentado até aos 27 °C. O reactor operou durante 80 dias com caudal de alimentação de 600 mL/dia, utilizando os mesmos suportes de imobilização que no processo descontínuo. Estes estudos revelaram que a produção de

vinho em contínuo utilizando células imobilizadas em diferentes tipos de suporte é mais eficiente que o processo em batch quer com células imobilizadas nos mesmos suportes quer com células livres. Constatou-se que a diminuição da temperatura afecta a produtividade de etanol, sendo o processo com células livres mais afectado do que os processos com células imobilizadas. A produtividade de etanol é também afectada pelo sistema de imobilização sendo superior no processo com alginato e inferior com  $\gamma$ -alumina. De uma forma geral, este estudo comprovou que para temperaturas entre os 7 e 27 °C o alginato apresenta uma maior eficiência na produtividade de etanol em ambos os processos descontínuo e contínuo sendo superior no processo contínuo, contudo segundo os autores é também destes três materiais o que apresenta maior custo associado em termos de técnicas de imobilização.

Takaya *et al.* (2002) estudaram o comportamento de um reactor de membrana a operar em contínuo para a produção de vinho seco à temperatura de 25°C. Estudaram a influência da taxa de diluição (razão entre o caudal de alimentação e o volume de reactor) na conversão dos açúcares em etanol concluindo que num reactor de membrana o consumo de açúcares aumenta na mesma proporção da taxa de diluição. Concluíram ainda que a concentração celular aumenta com o aumento da taxa de diluição, obtendo concentrações de células 60 vezes superiores ao observado em processos descontínuos. Estes autores estudaram ainda um processo contínuo de dois reactores em série com duplo reciclo sendo o primeiro um CSTF e o segundo um reactor de membrana com volume de 500 mL cada. Constataram que para produzir vinho seco em descontínuo seriam necessários 12 dias, enquanto que no processo contínuo utilizando um reactor de membrana de dois vasos o vinho seco é produzido com um tempo de retenção de 10 horas (à taxa de diluição de 0,1 h<sup>-1</sup>). Os resultados obtidos indicaram que este sistema consegue gerar produtividades 28 vezes superiores ao processo em descontínuo.

Diversas configurações de fermentadores são referidas na literatura com os mais variados suportes de imobilização e com as mais diversas condições de operação, nomeadamente temperatura, caudal de alimentação no caso do processo em contínuo, concentração de microorganismos, entre outros. Em todos os estudos o processo em contínuo é referido como o mais vantajoso, não só em termos económicos do ponto de

vista processual mas também em termos de produtividade e até qualidade dos vinhos produzidos. Apesar de uma grande parte dos estudos referirem o processo contínuo como uma tecnologia vantajosa, estes sistemas não são ainda implementados em grande escala, talvez devido à relutância por parte dos produtores em alterar um processo ao qual estão habituados ou simplesmente porque os estudos já efectuados não oferecem garantias suficientes sobre a rentabilidade de implementação de tais sistemas.





### 3 MATERAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MICROORGANISMO

Utilizou-se o produto ProRestart<sup>®</sup> que consiste em leveduras secas activas, *Saccharomyces cerevisiae* variedade *bayanus*, imobilizadas em esferas de alginato (FT155-04).

O produto ProRestart<sup>®</sup> necessita de uma etapa de re-hidratação antes da sua utilização. Para tal deixa-se estabilizar a temperatura desde a temperatura de armazenamento (4 °C) até à temperatura ambiente, de forma a evitar que o produto absorva a humidade do ar, e utiliza-se uma solução de água açucarada (sacarose 40 g/L) sendo o volume de solução 5 mL/g de esferas. A re-hidratação tem uma duração de 4-5 horas à temperatura de 37 °C imediatamente antes da inoculação. A diferença de temperatura entre o ProRestart<sup>®</sup> e o mosto não deverá ser superior a 10 °C, de forma a evitar um choque térmico das leveduras.

#### 3.2 MOSTO

O mosto utilizado é obtido a partir de uva branca e tem uma concentração de açúcar de 800 g/L, sendo posteriormente diluído para uma concentração de cerca de 200 g/L ou 100 g/L, dependendo da sua aplicação. Após a diluição e acerto do pH para 3,5, o mosto sofre uma filtração esterilizante, num sistema de filtração Millipore (filtro de 0,45 µm), sendo recolhido em frascos estéreis e armazenado a 4°C até à sua utilização.

#### 3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

##### 3.3.1 Biomassa

Dada a estrutura do produto ProRestart<sup>®</sup>, isto é, ao facto de as leveduras se encontrarem aprisionadas em matriz polimérica, há a possibilidade de estas crescerem para o exterior das esferas. Assim, de forma a acompanhar o crescimento de células livres em

suspensão recolheram-se amostras ao longo do tempo e mediu-se a densidade óptica por espectrofotometria a 620 nm, num espectrofotómetro Hach DR/2000.

De forma a quantificar a concentração celular realizou-se um ensaio com vista à obtenção de uma recta de calibração. Inoculou-se com uma concentração inicial de cerca de  $10^4$  células por mL e acompanhou-se o crescimento celular a uma temperatura constante (30 °C). Recolheram-se amostras ao longo do tempo para medir a densidade óptica e o número de células por mL, por contagem ao microscópio óptico, o que permitiu criar uma recta de calibração a partir da qual conhecendo a densidade óptica se pode determinar a concentração celular.

### 3.3.2 Açúcares

A análise do teor de açúcares (glucose e frutose) foi realizada por análise enzimática sequencial em equipamento ABX Pentra 400. O método implementado permite a determinação dos açúcares na gama de 0,5 a 5,0 g/L, pelo que foi necessário diluir as amostras cuja concentração fosse superior à gama de medição do equipamento. De forma a manter o rigor das medições, a diluição é feita com recurso a material com rigor volumétrico, nomeadamente balões e pipetas volumétricas.

O método de análise enzimática para a determinação de açúcares (glucose e frutose) consiste na fosforilação destes açúcares com adenosina-5'-trifosfato (ATP) catalisada pela enzima hexocinase (HK), formando-se glucose-6-fosfato (G-6-P) e frutose-6-fosfato (F-6-P) e simultânea formação de adenosina-5'-difosfato (ADP) (equações 1 e 2, respectivamente).



A F-6-P é convertida em G-6-P pela enzima fosfoglucose isomerase (PGI).



Na presença da enzima glucose-6-fosfato desidrogenase (G6P-DH), a G-6-P é oxidada pela nicotinamida-adenina-dinucléotido-fosfato ( $\text{NADP}^+$ ) a gluconato-6-fosfato com a formação de nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato reduzida (NADPH) (equação 4).



A quantidade de NADPH formada nesta reacção é directamente proporcional à concentração de glucose. Assim, determina-se a quantidade de NADPH pelo aumento da absorvância a 340 nm e obtém-se a concentração de glucose e frutose presente na amostra a analisar.

### 3.3.3 Etanol

A concentração de etanol foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O equipamento é composto por um detector de índice de refacção Gilson, modelo 131, com uma amplitude de  $3 \times 10^{-4}$  RIUFS, uma bomba Guilson 307, um integrador Spectra-physics SP4290, uma cabeça de injeção Rheodyne 7125 (20  $\mu\text{L}$ ) e uma coluna modelo EuroKat H (300x8) com partículas de dimensão de 10  $\mu\text{m}$ . O eluente utilizado foi uma solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0,01N) alimentado a um caudal de 0,4 mL/min.

## 3.4 DIFUSÃO DE AÇÚCAR EM ESFERAS DE ALGINATO

Para estudar a cinética de difusão de açúcar em esferas de alginato com leveduras inactivas colocou-se uma determinada carga de esferas em mosto filtrado e acompanhou-se a evolução da concentração de açúcar presente no mosto ao longo do tempo. A concentração inicial de mosto era cerca de 200 g/L e o volume final (esferas e mosto) de 430 mL.

Este estudo foi realizado para cargas de 320 g/L, 200 g/L, 150 g/L e 100 g/L de ProRestart<sup>®</sup>. Antes de se iniciar o estudo, submeteram-se as esferas a uma temperatura de 80°C durante 30 minutos com a finalidade de inactivar termicamente as leveduras, de forma a garantir que diminuição da concentração de açúcar no mosto se devia apenas ao

fenômeno de difusão e não à fermentação. De seguida, colocou-se cada uma das diferentes cargas de esferas em frascos de 500 mL e perfez-se, com mosto, até ao volume total de 430 mL. Recolheram-se várias amostras ao longo de 1 hora e mediu-se a concentração de açúcares (glucose e frutose) em solução. A diferença entre a concentração de açúcar em cada instante e a concentração inicial permite quantificar o açúcar que se difunde para o interior das esferas.

### **3.5 FERMENTAÇÃO EM DESCONTÍNUO**

O estudo da cinética de fermentação em descontínuo com diferentes cargas de ProRestart<sup>®</sup> foi realizado com mosto filtrado com uma concentração de açúcar de aproximadamente 200 g/L, a 19,5 °C e volume total de 430 mL. Neste estudo realizaram-se ensaios com meio agitado e com meio não agitado.

Para a realização do estudo com meio não agitado utilizaram-se cargas de ProRestart<sup>®</sup> de 320 g/L, 250 g/L, 200 g/L, 150 g/L e 100 g/L. A fermentação foi realizada em descontínuo em balões Erlenmeyer com capacidade de 500 mL, com um ponto de amostragem na zona inferior lateral, fechados com rolhas de algodão para permitir a troca de gases e manter a esterilidade. Após a hidratação, transferiram-se as esferas para o Erlenmeyer e perfez-se com mosto até um volume total de 430mL. Recolheram-se várias amostras ao longo do tempo com seringas estéreis.

Para cada uma das cargas, realizou-se uma primeira fermentação e posteriormente uma segunda fermentação nas mesmas condições (concentração inicial de mosto, temperatura e volume total) reutilizando as esferas da primeira fermentação, após uma lavagem com água. Desta forma pretendia-se avaliar o seu desempenho quando reutilizadas. Todos os ensaios foram realizados em duplicado.

Nas mesmas condições de temperatura, concentração de açúcar no mosto e volume total, realizou-se o estudo da cinética de fermentação em descontínuo com agitação magnética do meio reaccional. A agitação imposta permitiu manter as esferas em suspensão e com uma distribuição uniforme no interior do Erlenmeyer garantindo a ausência de esmagamento. Neste caso, apenas se estudou o comportamento fermentativo de duas cargas de ProRestart<sup>®</sup>, 100 g/L e 200 g/L. Os ensaios foram realizados sem

duplicação e não se estudou o efeito da reutilização das esferas.

De modo a garantir ausência de contaminações todo o material utilizado foi previamente esterilizado por acção térmica em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

### **3.5.1 Influência da Temperatura**

Estudou-se a fermentação em descontínuo a diferentes temperaturas no intervalo de [10 - 24,5] °C. Utilizou-se mosto filtrado com uma concentração de açúcar de 100 g/L, volume total de 430 mL e carga de ProRestart® de 150 g/L. As fermentações foram realizadas em banho termostaticado, seguindo a metodologia já descrita para as fermentações em descontínuo sem agitação do meio.

## **3.6 FERMENTAÇÃO EM CONTÍNUO**

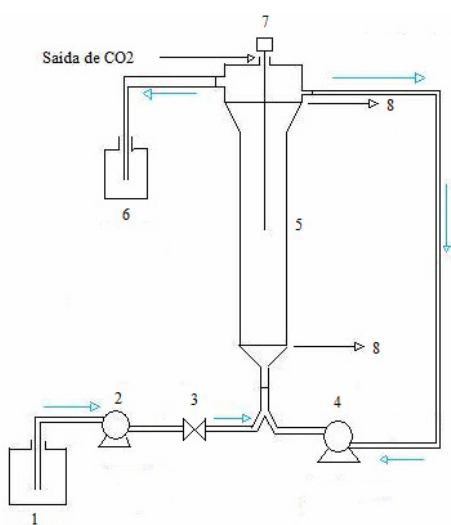
Estudou-se a cinética de fermentação em contínuo utilizando-se mosto filtrado com uma concentração de açúcar de 200 g/L e massa de ProRestart® de 150 g.

Um factor que poderia causar dificuldades processuais consiste na remoção de CO<sub>2</sub>. O fermentador foi especialmente desenhado para permitir uma boa circulação de gases, possuindo na parte superior uma zona de expansão que facilita a libertação do CO<sub>2</sub>. De modo a impedir a saída das esferas pelo topo, colocou-se uma grelha perfurada na parte superior do fermentador e verificou-se que com perfurações de 1mm de diâmetro a libertação de gás era deficiente. Aumentando-se a perfuração para 1,5 mm de diâmetro a libertação de CO<sub>2</sub> passou a ser eficiente, resolvendo-se assim os problemas associados à remoção de gás.

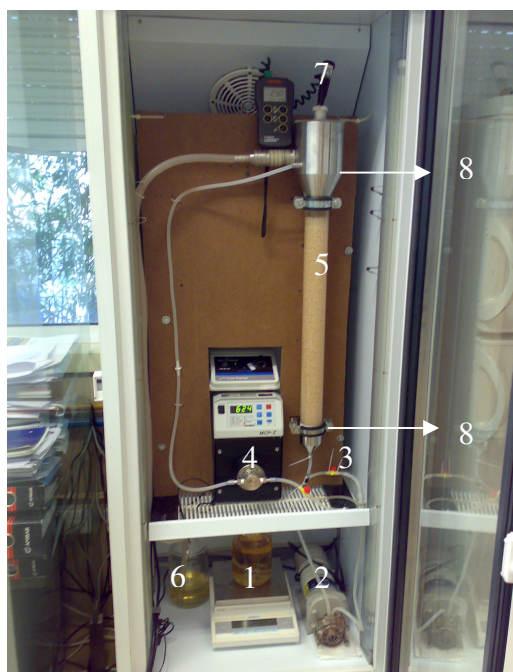
O aumento do diâmetro das esferas de ProRestart® no decorrer da fermentação foi um dos factores considerados na preparação deste ensaio. Assim, houve uma preocupação em utilizar uma determinada carga de esferas cujo volume ocupado não excedesse mais de metade do volume total do reactor, de forma a permitir a expansão do leito por aumento do diâmetro das esferas (facto observado no decorrer do ensaio) sem correr o risco de sobrecarga do reactor.

### 3.6.1 Montagem experimental

A montagem experimental, apresentada Figura 4, consiste num fermentador tubular vertical, de volume total de 1,1L, alimentado pela base com auxílio de uma bomba peristáltica Masterflex L/S modelo 7553-89, com um caudal médio de 0,6 mL/min. De modo a possibilitar a fluidização do leito, o sistema funcionou com reciclo, a um caudal de 570 mL/min (R=950), imposto por uma bomba Ismatec MCP-Z Standard. O caudal de alimentação foi medido com o auxílio de uma balança colocada sob o frasco de alimentação, registando-se o abaixamento da massa do frasco de alimentação ao longo do tempo. A parte superior do fermentador é rolhada com tampa de algodão de modo a permitir trocas gasosas facilitando a remoção de CO<sub>2</sub>. Uma válvula anti-retorno foi colocada na ligação entre a tubagem de alimentação e o fermentador de modo a impedir a contaminação da alimentação. Todo o sistema foi colocado numa câmara de temperatura regulável a  $19 \pm 1$  °C.



1 – Frasco de alimentação; 2 – bomba de alimentação; 3 – válvula anti-retorno; 4 – bomba de recirculação; 5 – fermentador; 6 – frasco de recolha; 7 – termómetro; 8 – grelhas de retenção



**Figura 4:** Esquema e imagem da montagem experimental do processo de fermentação contínua de mosto.

### **3.6.2 Esterilização do material**

Para garantir a esterilidade do sistema fez-se passar durante cerca de uma hora uma solução desinfectante de Divosan Activ 0,5%. Após descarga, lavou-se com água desionizada estéril até total remoção da solução desinfectante, o que se comprova com bandas colorimétricas de detecção de ácido paracético, princípio activo da solução desinfectante utilizada. Os frascos de alimentação e recolha foram esterilizados por calor húmido em autoclave à temperatura de 121 °C durante 15 minutos.

### **3.6.3 Funcionamento**

Após a esterilização efectuou-se a carga do fermentador pelo topo com as esferas de ProRestart<sup>®</sup> re-hidratadas e mosto (o mosto funcionou como meio líquido para suspender as esferas, por meio de agitação manual, facilitando, deste modo, a transferência das esferas para o fermentador). O sistema permaneceu em funcionamento descontínuo com reciclo total até se obter uma concentração de açúcar de cerca de 2 g/L, o que se verificou ao fim de 20 horas. Após colocar os frascos de alimentação e recolha iniciou-se a alimentação ao fermentador proveniente do frasco 1. Ao longo do tempo recolheram-se amostras no topo do fermentador (com auxílio de pipetas descartáveis estéreis) para análise da concentração de açúcar, de etanol e da densidade óptica. Em cada recolha de amostras registou-se a temperatura e mediu-se o caudal de alimentação.





## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudou-se o processo de fermentação alcoólica de mosto com a levedura do género *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em esferas de alginato, designada comercialmente por ProRestart®. Realizaram-se ensaios em descontínuo em diferentes condições, avaliando-se o efeito da difusão de açúcares, da carga de esferas, da agitação do meio e da temperatura. Posteriormente, realizou-se um ensaio em contínuo num reactor de leito fluidizado com reciclo, com o objectivo de avaliar a possibilidade de implementação a nível industrial. Por fim, realizou-se um pré-estudo de viabilidade económica do processo de fermentação alcoólica em contínuo utilizando ProRestart®.

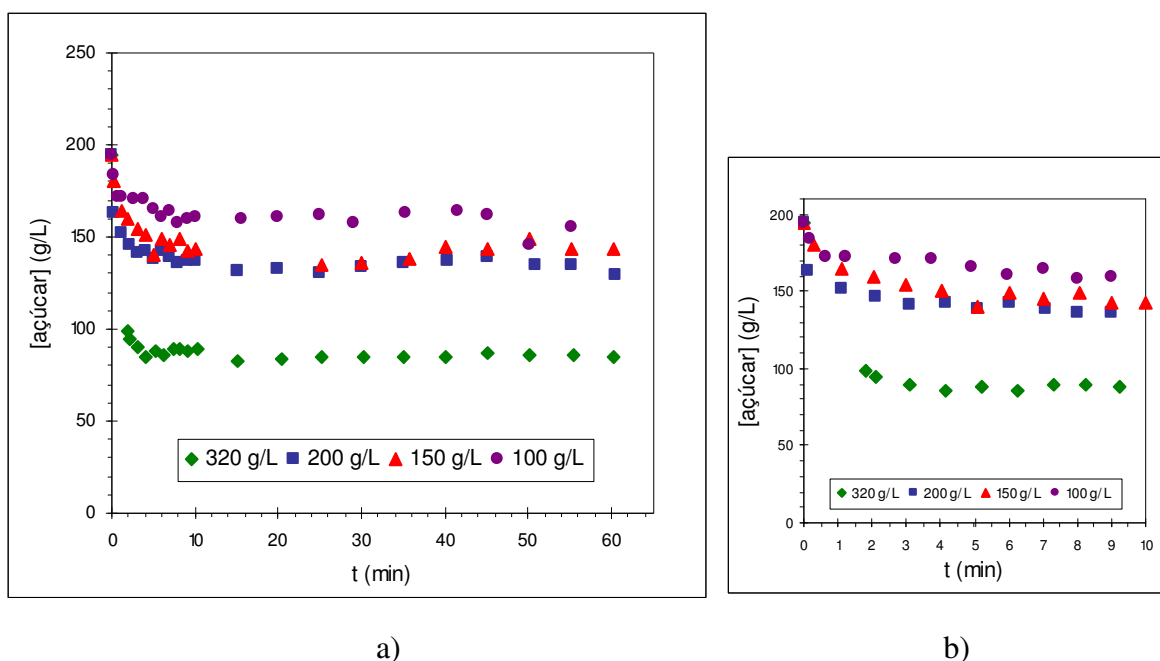
### 4.1 CINÉTICA DE DIFUSÃO

O motivo deste estudo prende-se com observações da redução rápida (quase instantânea) da concentração de açúcares nos instantes iniciais dos processos de fermentação. Assim, o objectivo deste estudo consistiu na determinação da cinética de difusão de açúcares para o interior das esferas de alginato de forma a conhecer o momento em que se inicia a fermentação propriamente dita, suspeitando-se que no início a redução da concentração de açúcar se deve essencialmente ao fenómeno de difusão.

Realizaram-se ensaios com diferentes cargas de ProRestart® sendo estas 320 g/L, 200 g/L, 150 g/L e 100 g/L que correspondem aos ensaios 1, 2, 3 e 4, respectivamente. O estudo foi realizado com células termicamente inactivas de forma a garantir que o consumo de açúcar se deve apenas ao fenómeno de difusão. Na Figura 5 apresentam-se os resultados obtidos, concentração de açúcar versus tempo, para as diferentes cargas de ProRestart®. Os restantes dados relativos a estes ensaios são apresentados na Tabela 5.

Analisando os resultados apresentados na Figura 5 verifica-se que para cargas superiores, a variação da concentração de açúcares é mais abrupta nos momentos iniciais, enquanto que para cargas inferiores se verifica uma diminuição da concentração de açúcares menos acentuada. Pela análise da Figura 5 poderia afirmar-se que quanto maior é a carga de esferas utilizadas, maior é a quantidade de açúcar adsorvida, no entanto esta

constatação é apenas aparente pois à medida que a carga de esferas aumenta, o volume de mosto diminui, diminuindo também a massa de açúcar presente. Assim, a massa de açúcar no final do ensaio com carga de 320 g/L é inferior à observada nos outros ensaios pois o mesmo se verifica no início desse ensaio, não se podendo tirar estas conclusões sobre o consumo de açúcar directamente pela observação da Figura 5.



**Figura 5:** a) Concentração de açúcar para diferentes cargas de ProRestart<sup>®</sup> termicamente desactivado; b) ampliação da zona inicial.

**Tabela 5:** Resultados experimentais e valores calculados referentes ao estudo de difusão de açúcares.

Ensaio	1	2	3	4
W (g)	137,6	86,0	64,5	43,0
V <sub>L</sub> <sup>*</sup> (mL)	165,0	262,5	305,0	340,0
S <sub>0</sub> (g/L)	194,5	194,5	194,5	194,5
S <sub>f</sub> (g/L)	84,9	135,5	143,4	162,1
C <sub>r</sub> (g <sub>esf</sub> /L <sub>reactor</sub> )	320	200	150	100
C <sub>L</sub> (g <sub>esf</sub> /L <sub>mosto</sub> )	833,9	327,6	211,5	126,5
M <sub>i,aç</sub> (g)	32,1	51,1	59,3	66,1
M <sub>f,aç</sub> (g)	14,0	35,6	43,7	55,1
M <sub>dif,aç</sub> (g)	18,1	15,5	15,6	11,0
M <sub>aç/esf</sub> (g <sub>aç</sub> /g <sub>esf</sub> )	0,131	0,180	0,242	0,257

\*Variou-se o volume de mosto com o objectivo de manter o volume total constante (=430 mL)

Observando os resultados apresentados na Tabela 5, nomeadamente a massa de açúcar adsorvida por grama de esfera, verifica-se que o aumento da carga de esferas resulta na diminuição da quantidade de açúcar adsorvido. O aumento da carga de esferas resulta na diminuição do volume de mosto utilizado mantendo constante o volume total. Desta forma, quanto maior é a carga de esferas utilizada, menor é o volume de mosto e consequentemente menor é a massa inicial de açúcar presente em cada ensaio, o que explica a diminuição da quantidade de açúcar adsorvido quando se aumenta a carga de esferas. O aumento da carga de esferas resulta, também, num maior empacotamento o que pode provocar um aumento das limitações difusionais externas à transferência de massa e consequentemente diminuir a quantidade de açúcar adsorvida por massa de esferas.

Com o intuito de descrever o processo de difusão de açúcares para o interior das esferas de alginato, testou-se um modelo de pseudo 2ª ordem, utilizado para descrever diversos processos de adsorção (Al-Rub *et al*, 2004; Jiang *et al*, 2007).

### Modelo descritivo da difusão de açúcar em esferas de alginato

Cinética de pseudo 2ª ordem:

$$\frac{dq}{dt} = k_{ad} (q_e - q)^2 \quad \text{com} \quad q = (S_0 - S) \frac{W}{V_L} \quad (5)$$

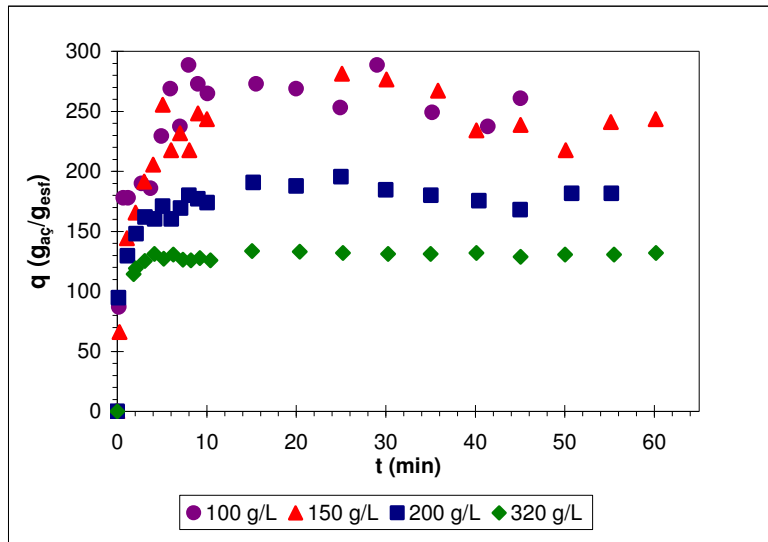
onde  $q$  representa a quantidade de açúcar adsorvida ( $g_{aç}/g_{esf}$ ),  $q_e$  a quantidade de açúcar adsorvida no equilíbrio ( $g_{aç}/g_{esf}$ ),  $k_{ad}$  a constante de velocidade de adsorção ( $g_{esf}/g_{aç} \cdot \text{min}$ ),  $S_0$  a concentração inicial de açúcar no mosto ( $g_{aç}/L$ ),  $S$  a concentração de açúcar no mosto ( $g_{aç}/L$ ),  $W$  a massa de catalisador (esferas secas) (g) e  $V_L$  o volume de mosto (L).

Após integração e linearização obtém-se a equação 6.

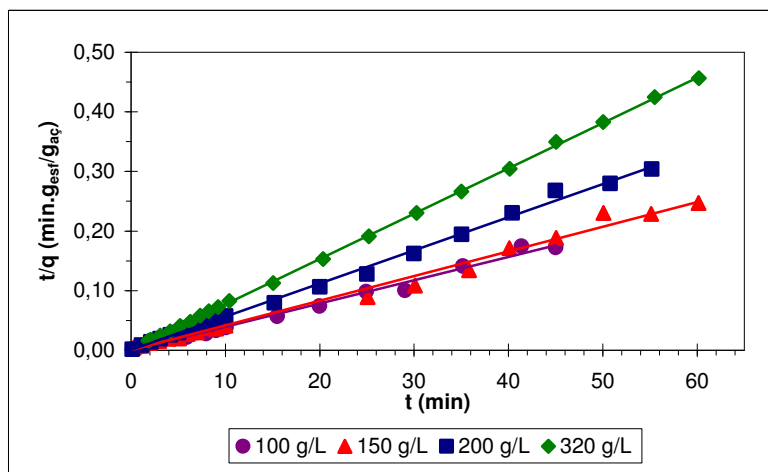
$$\frac{t}{q} = \frac{1}{k_{ad} q_e^2} + \frac{1}{q_e} t \quad (6)$$

que representa uma recta com declive  $1/q_e$  e ordenada na origem de  $1/(k_{ad} q_e^2)$ .

A variação da quantidade de açúcar adsorvida ao longo do tempo para as diferentes cargas de ProRestart<sup>®</sup> pode ser observada na Figura 6a e os resultados obtidos da linearização da equação cinética de pseudo segunda ordem são apresentados na Figura 6b e Tabela 6.



a)



b)

**Figura 6:** Quantidade de açúcar adsorvida ao longo do tempo, para diferentes cargas de ProRestart<sup>®</sup>.

Da representação gráfica dos resultados experimentais (Figura 6b), verifica-se que estes se ajustam a uma recta, pelo que se pode afirmar que o fenómeno de difusão de

açúcar em esferas de alginato segue uma cinética de pseudo 2ª ordem. Desta relação é possível determinar a quantidade adsorvida no equilíbrio,  $q_e$ , através do declive, e a constante de velocidade de adsorção,  $k_{ad}$ , através da ordenada na origem (Tabela 6).

**Tabela 6:** Parâmetros cinéticos obtidos a partir da linearização da equação cinética de pseudo 2ª ordem.

$C_r$ (g/L)	$k_{ad}$ ( $g_{est}/(g_{ac} \cdot min)$ )	$q_e$ ( $g_{ac}/g_{est}$ )	$S_{e,b}$ (g/L)
320	0,0512	131,5	84,9
200	0,0438	179,9	135,5
150	0,0468	241,8	143,4
100	0,0420	256,6	162,1

Observando os resultados apresentados na Tabela 6 verifica-se que  $q_e$  varia inversamente com a carga de esferas e que  $k_{ad}$  é praticamente constante em todos os ensaios, sendo apenas um pouco superior para a carga de esferas de 320 g/L. Desta forma, propõe-se um modelo para a difusão de açúcares considerando um valor médio da constante de velocidade de adsorção,  $k_{ad}$ , de 0,0459  $g_{est}/g_{ac} \cdot min$  e a carga de esferas como sendo função da quantidade de açúcar adsorvida no equilíbrio (equação 7).

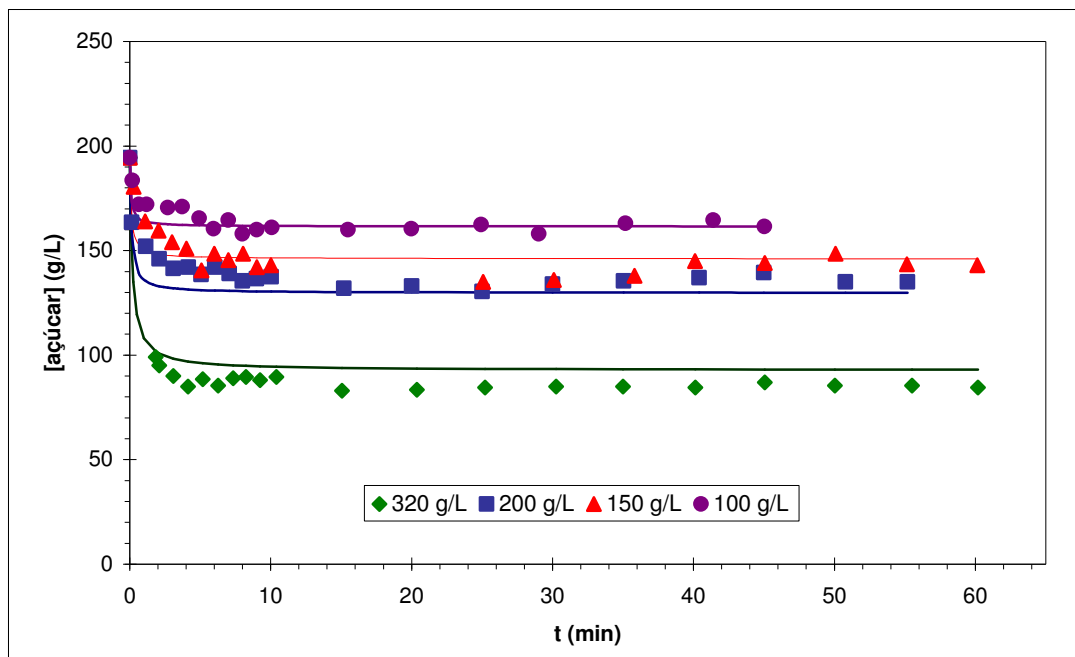
$$C_r = -1,586q_e + 513,6 \quad (r^2 = 0,945) \quad (7)$$

Conhecendo o valor de  $q_e$  e de  $k_{ad}$  é possível reproduzir um modelo que se ajusta aos dados experimentais (Figura 7), em que a concentração de açúcar calculada pelo modelo ( $S_{calc}$ ) é dada por:

$$S_{calc} = S_0 - \frac{q_{calc} \times W}{V_L} \quad (8)$$

com

$$q_{calc} = q_e - \frac{1}{\frac{1}{q_e} + k_{ad} t} \quad (9)$$



**Figura 7:** Concentração de açúcar ao longo do tempo e modelo descritivo da difusão dos açúcares para o interior das esferas, para diferentes cargas de ProRestart® termicamente desactivado.

Pela observação dos resultados apresentados na Figura 7, verifica-se que o modelo proposto se adequa aos resultados experimentais, notando-se um maior desvio na carga de esferas de 320 g/L. Observando os resultados apresentados na Tabela 6, verifica-se que o valor da constante de velocidade de adsorção,  $k_{ad}$ , é um pouco superior para a carga de esferas de 320 g/L, relativamente ao verificado para as outras cargas. Este factor pode estar na origem dos desvios do modelo aos pontos experimentais, já que se considerou um valor médio de  $k_{ad}$  para desenvolver o modelo descritivo da difusão dos açúcares presentes no mosto (glucose e frutose) em esferas de alginato.

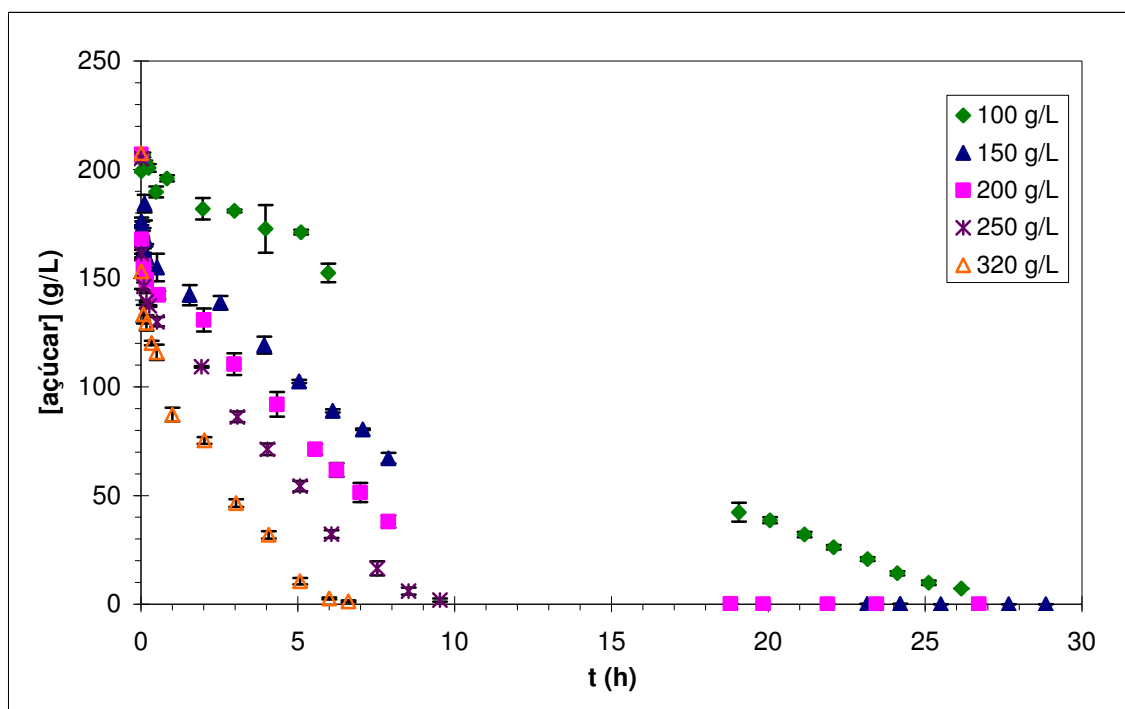
## 4.2 FERMENTAÇÃO EM DESCONTÍNUO

### 4.2.1 Influência da Carga de Levedura Imobilizada

- Fermentação em descontínuo sem agitação do meio reaccional

Neste estudo, foram conduzidos cinco processos de fermentação em descontínuo, em meio não agitado, utilizando diferentes cargas de ProRestart®, previamente hidratado,

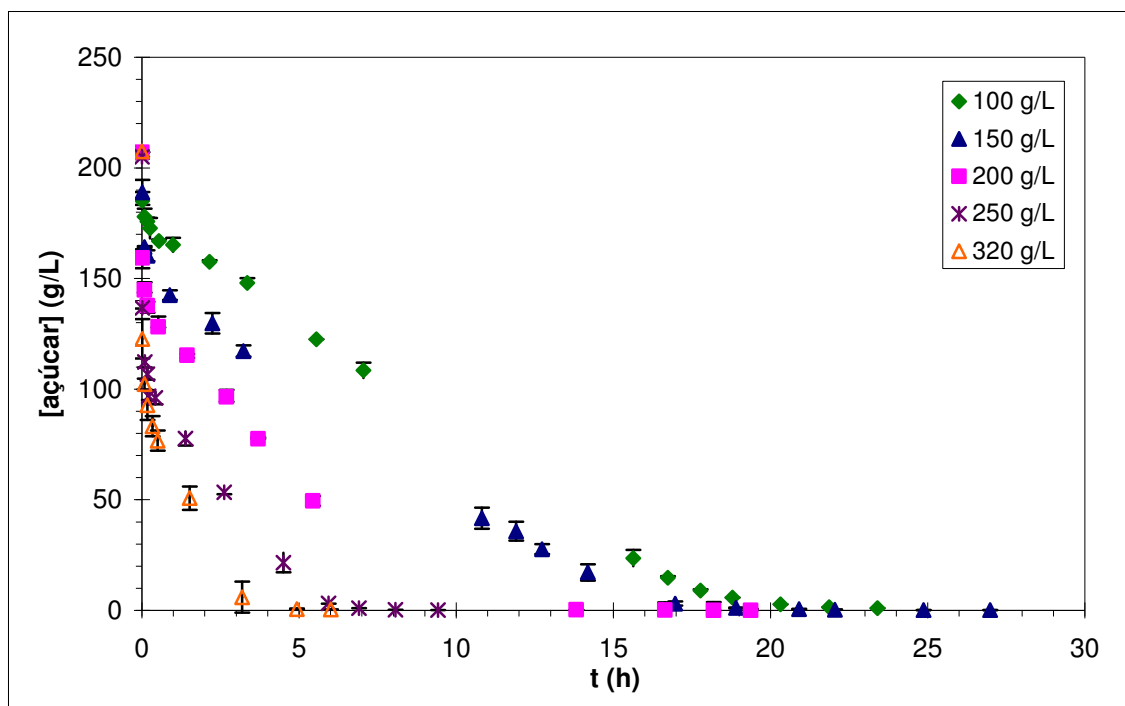
com a finalidade de determinar a cinética de fermentação. Os resultados obtidos neste estudo são apresentados nas Figuras 8 e 9.



**Figura 8:** Concentração de açúcares na fermentação descontínua de mosto, sem agitação do meio reaccional, para as diferentes cargas de ProRestart®, com uma primeira utilização das esferas.

Na Figura 8, apresentam-se os resultados obtidos no processo de fermentação alcoólica em descontínuo sem agitação do meio reaccional, com diferentes cargas de ProRestart®, com uma primeira utilização do produto. Com base nos resultados verificam-se essencialmente dois comportamentos distintos. Nos instantes iniciais, verifica-se um decaimento da concentração de açúcar acentuado que tende a estabilizar, iniciando-se de seguida um novo decaimento já menos acentuado, sendo este comportamento mais visível nos ensaios com menor carga de esferas. O mesmo pode ser observado nos ensaios realizados com a reutilização das esferas (Figura 9), embora seja menos notório pois o decaimento mais acentuado da concentração de açúcares referente aos momentos iniciais da fermentação ocorre num menor período de tempo.





**Figura 9:** Concentração de açúcares na fermentação descontínua de mosto, sem agitação do meio reaccional, para as diferentes cargas de ProRestart®, com reutilização das esferas.

A fermentação é um processo lento, principalmente na fase de arranque (fase inicial) pois as leveduras necessitam de um período de adaptação ao meio. Contrariamente ao processo de fermentação, o processo de difusão de açúcares para o interior das esferas de alginato inicia-se quase instantaneamente, como se comprovou no estudo de difusão apresentado no ponto 4.1. Deste modo, pode-se afirmar que nos momentos iniciais, o desaparecimento de açúcar se deve ao fenómeno de difusão e não de fermentação.

Constata-se, também, que o aumento da carga de esferas resulta numa diminuição do tempo necessário para fermentar todo o açúcar presente no mosto, o que já era esperado uma vez que a carga de esferas é proporcional à quantidade de levedura presente.

Numa primeira análise, para descrever os resultados experimentais admitiu-se uma cinética de fermentação descrita pelas velocidades iniciais de consumo de açúcar,  $r_0$ , ajustando-se os pontos experimentais a uma recta, possibilitando ter uma noção da velocidade de consumo de açúcares através do seu declive.

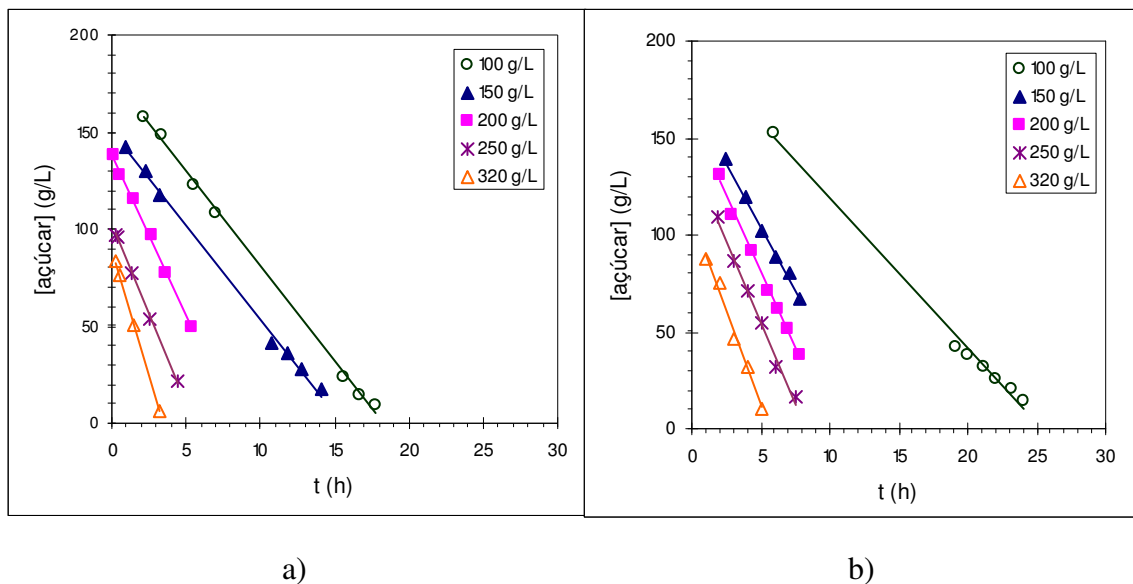
Como se trata de um processo descontínuo, onde não há entrada nem saída de substrato, a velocidade de reacção pode ser descrita pela equação 10, (Shuker e Kargi, 2002).

$$r = -\frac{dS}{dt} \quad (10)$$

Assumindo que a velocidade de reacção é dada pela velocidade inicial vem,

$$-\frac{dS}{dt} = r_0 \quad (11)$$

Para determinar do momento a partir do qual se considera o início do processo de fermentação tomou-se como ponto de partida a concentração de açúcar verificada no equilíbrio, determinada no estudo de difusão, rejeitando-se os pontos iniciais onde predomina o fenómeno de difusão. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 10 e na Tabela 7



**Figura 10:** Velocidade de consumo de açúcares, para as diferentes cargas de ProRestart<sup>®</sup>, para a a) primeira utilização e b) segunda utilização das esferas, nos ensaios de fermentação em descontínuo sem agitação do meio reaccional.

Analisando os resultados apresentados na Figura 10 e na Tabela 7, verifica-se que o aumento da carga de esferas resulta no aumento da velocidade de consumo de açúcares, isto é, o aumento da carga de esferas favorece a velocidade de fermentação. Verifica-se ainda, que a velocidade de consumo de açúcares é semelhante entre a primeira utilização e a reutilização das esferas, com relevante excepção da carga de 320g/L em que se verifica

um aumento significativo da velocidade de consumo dos açúcares. Em relação ao ensaio com 100 g/L de ProRestart®, com reutilização das esferas, é um pouco forçado assumir a velocidade inicial com os pontos representados. No entanto, devido ao período da noite, não foi possível recolher um maior número de amostras nas primeiras horas de fermentação. Relativamente ao ensaio realizado com uma carga de 150g/L, a primeira utilização das esferas apresenta uma velocidade de consumo superior ao caso em que há reutilização das esferas, o que certamente terá ocorrido devido a um erro experimental. No decorrer deste ensaio, verificou-se que a bomba do banho termostaticado desligou, no período da noite, o que levou à diminuição acentuada da temperatura do banho, influenciando a velocidade de fermentação. Este erro experimental demonstra claramente a influência da temperatura nos processos de fermentação.

**Tabela 7:** Velocidades de consumo de açúcar, respectivos erros associados e coeficiente de correlação, para as diferentes cargas de ProRestart®, nos ensaios de fermentação em descontínuo, sem agitação do meio reaccional.

<b>C<sub>r</sub></b> <b>(g/L)</b>	<b>r<sub>0</sub> ± σ</b> <b>(g/L.h)</b>		<b>Coeficiente de Correlação</b>	
	<b>1ª Utilização</b>	<b>Reutilização</b>	<b>1ª Utilização</b>	<b>Reutilização</b>
<b>320</b>	19 ± 4	27 ± 2	0,986	0,999
<b>250</b>	17 ± 2	18 ± 1	0,992	0,998
<b>200</b>	15 ± 1	16 ± 1	0,997	0,998
<b>150</b>	13 ± 1	9,6 ± 0,5	0,996	0,998
<b>100</b>	7,7 ± 0,7	9,7 ± 0,4	0,993	0,999

Embora se verifique uma ligeira diferença na velocidade de consumo de açúcares entre a primeira utilização das esferas e a sua reutilização, em quase todos os casos essa diferença é de cerca de uma ou duas unidades, com excepção do caso em que se utiliza a carga de esferas de 320 g/L. Neste caso a diferença é de aproximadamente oito unidades, contudo o erro associado a este ensaio é também bastante superior comparativamente com os outros ensaios, o que pode explicar as diferenças de consumo entre a primeira fermentação e a reutilização das esferas, neste caso.

A velocidade específica de consumo de substrato é um parâmetro usualmente

utilizado para descrever os processos de fermentação. Por norma, este parâmetro determina a velocidade de consumo de substrato relativamente à concentração de levedura utilizada, no entanto, quando a levedura se encontra imobilizada, poderá ser mais vantajoso conhecer a velocidade específica de consumo relativamente à carga de biocatalisador (levedura e suporte de imobilização) representada pela equação 12.

$$q_s = -\frac{1}{C_L} \frac{dS}{dt} \quad (12)$$

onde  $q_s$  representa a velocidade específica de consumo de açúcar ( $g_{ac}/g_{esf} \cdot h$ ),  $C_L$  a razão entre as fases sólida e líquida (massa de ProRestart® por unidade volúmica de mosto) ( $g_{esf}/L_{mosto}$ ),  $S$  a concentração de açúcares ( $g/L$ ) e  $t$  o tempo de reacção ( $h$ ).

Na Tabela 8 são apresentadas as velocidades específicas de consumo de açúcares calculadas para as diferentes cargas de ProRestart®.

**Tabela 8:** Velocidade de consumo e velocidade específica de consumo de açúcares para as diferentes cargas de ProRestart®, com uma primeira utilização das esferas e a sua reutilização, na fermentação descontínua sem agitação do meio.

	$C_r$ ( $g_{esf}/L_{reactor}$ )	$r_0 \pm \sigma$ ( $g_{ac}/L_{mosto} \cdot h$ )	$q_s \pm \sigma$ ( $g_{ac}/g_{esf} \cdot h$ )
<b>1ª Utilização</b>	320	$19 \pm 4$	$0,026 \pm 0,006$
	250	$17 \pm 2$	$0,037 \pm 0,005$
	200	$15 \pm 1$	$0,048 \pm 0,003$
	150	$13 \pm 1$	$0,063 \pm 0,006$
	100	$7,7 \pm 0,7$	$0,062 \pm 0,006$
<b>Reutilização</b>	320	$27 \pm 2$	$0,029 \pm 0,002$
	250	$18 \pm 1$	$0,033 \pm 0,003$
	200	$16 \pm 1$	$0,049 \pm 0,003$
	150	$9,6 \pm 0,5$	$0,043 \pm 0,002$
	100	$9,7 \pm 0,4$	$0,076 \pm 0,003$

A velocidade específica de consumo de açúcares é um parâmetro relativo à produtividade associada ao consumo de açúcares. Este parâmetro permite avaliar o processo de fermentação independentemente da carga de biocatalisador utilizada. Pela análise dos resultados apresentados na Tabela 8, verifica-se que a velocidade específica de consumo diminui com o aumento da carga de esferas, o que indica que o consumo de

açúcar diminui quando a carga de esferas aumenta. Este facto pode ser explicado pelo empacotamento das esferas, isto é, o aumento da carga de esferas resulta num maior empacotamento fazendo com que o desempenho das leveduras imobilizadas diminua devido à elevada carga que se encontra na vizinhança. Deste modo, embora o consumo de açúcar seja maior para cargas superiores, devido ao aumento da massa de biocatalisador, a quantidade consumida por unidade mássica de esferas é inferior.

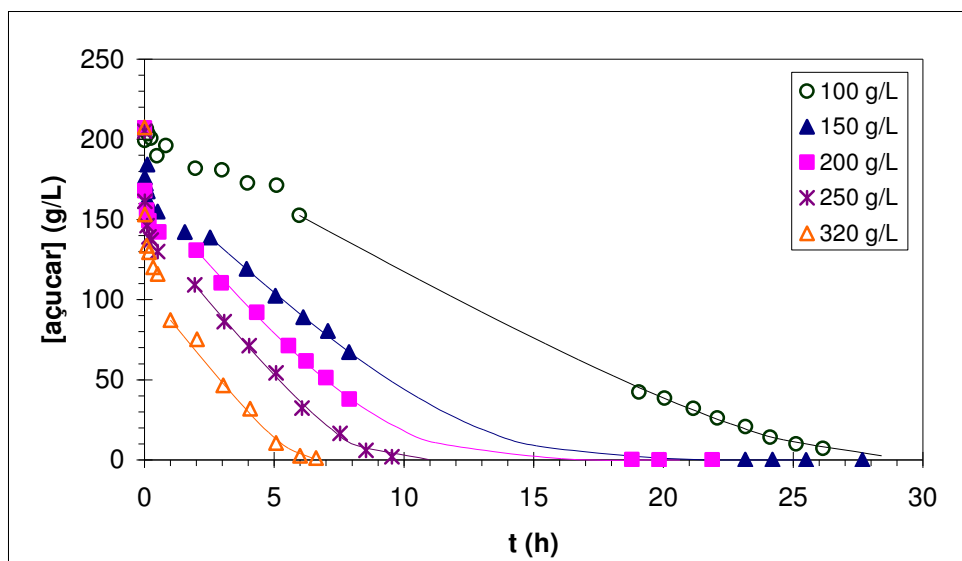
A utilização de sistemas de imobilização celular, como é o caso do ProRestart<sup>®</sup>, permite assumir a hipótese de que a concentração de biomassa e consequentemente a concentração de enzima se mantêm constantes ao longo da fermentação. Pressupondo que não há crescimento celular torna-se viável a aplicação da equação de Michaelis-Menten para descrever a cinética de fermentação de mosto. Deste modo, testou-se uma segunda abordagem para determinar a cinética de fermentação, utilizando a equação de Michaelis-Menten na sua forma integrada (equação 13).

$$t = -\frac{K_m}{r_{\max}} \ln \frac{S}{S_0} + \frac{(S_0 - S)}{r_{\max}} \quad (13)$$

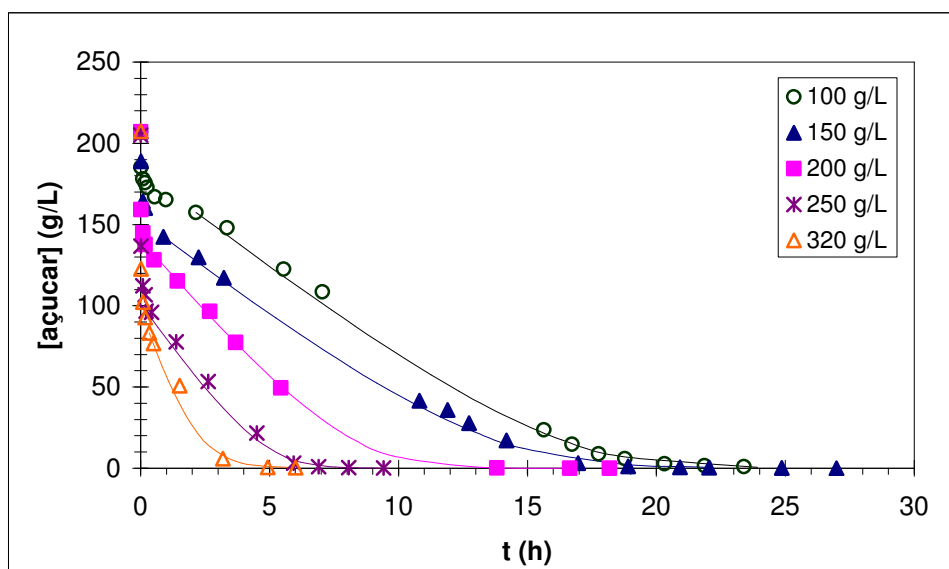
A partir da equação 13 é possível obter uma estimativa dos parâmetros  $K_m$  e  $r_{\max}$  (Tabela 9) por ajuste aos dados experimentais (regressão não linear), minimizando o quadrado dos erros entre o tempo determinado experimentalmente e o tempo calculado pelo modelo. Conhecidos estes parâmetros é possível determinar a velocidade da reacção representada na Figura 11.

**Tabela 9:** Parâmetros  $K_m$  e  $r_{\max}$  da equação de Michaelis-Menten para a primeira utilização das esferas e a sua reutilização, na fermentação descontínua de mosto sem agitação do meio.

	1ª Utilização		Reutilização	
$C_r$ (g/L)	$K_m$ (g/L)	$r_{\max}$ (g/L.h)	$K_m$ (g/L)	$r_{\max}$ (g/L.h)
<b>320</b>	8	22	56	73
<b>250</b>	14	22	20	27
<b>200</b>	40	24	27	22
<b>150</b>	35	18	28	14
<b>100</b>	17	9,8	24	14



a)



b)

**Figura 11:** Concentração de açúcares ao longo do tempo na fermentação descontínua de mosto, para diferentes cargas de ProRestart<sup>®</sup>, com a) primeira utilização e b) segunda utilização das esferas (os pontos representam os resultados experimentais e as curvas o ajuste à equação de Michaelis-Menten).

Com base nos resultados apresentados na Figura 11 pode afirmar-se que a equação de Michaelis-Menten é adequada para modelar a velocidade de consumo de açúcar na fermentação de mosto com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em alginato.

Pode verificar-se pela análise dos resultados apresentados na Tabela 9, que o parâmetro  $K_m$  varia com a carga de esferas apresentando um valor máximo para uma carga de 200g/L no caso da primeira utilização das esferas e para uma carga de 150g/L no caso da reutilização das esferas.  $K_m$  é um parâmetro que define a afinidade entre o substrato e a enzima, que varia apenas com a temperatura e pH do meio (Shuler e Kargi, 2002). Tendo isto em conta, não é possível explicar, sem um estudo mais aprofundado, qual a razão para a variação do valor de  $K_m$  observada.

No que diz respeito a  $r_{max}$ , este parâmetro depende da concentração total de enzima e da constante cinética (Shuler e Kargi, 2002). Tendo em conta que o aumento da carga de esferas se traduz no aumento da quantidade de biomassa utilizada e portanto de enzima, seria de esperar que  $r_{max}$  aumentasse com o aumento da carga de esferas. No entanto, pelos resultados apresentados na Tabela 9, não se verifica o comportamento anteriormente descrito.

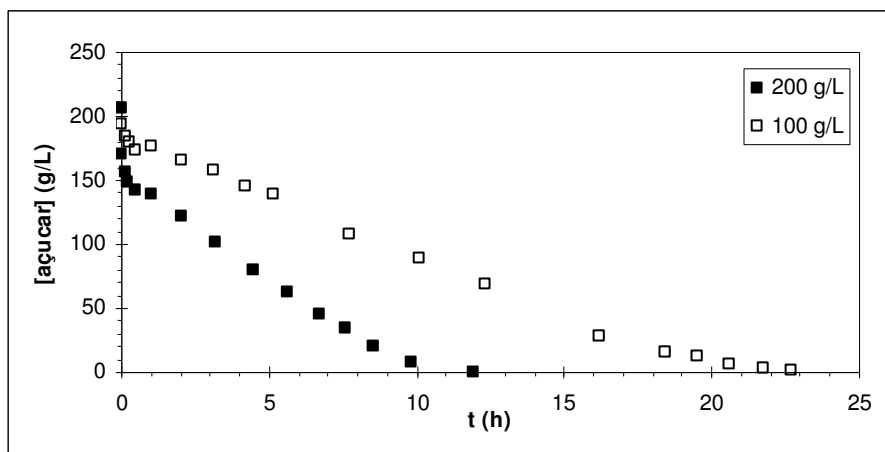
Embora se verifique um ajuste adequado da equação de Michaelis-Menten aos resultados experimentais, os parâmetros  $K_m$  e  $r_{max}$  não apresentam o comportamento esperado. Possivelmente, o pressuposto assumido de que a concentração de enzima se mantém constante ao longo do tempo poderá não ser válido, influenciando assim os parâmetros de Michaelis-Menten  $K_m$  e  $r_{max}$ .

- Fermentação em descontínuo com agitação do meio

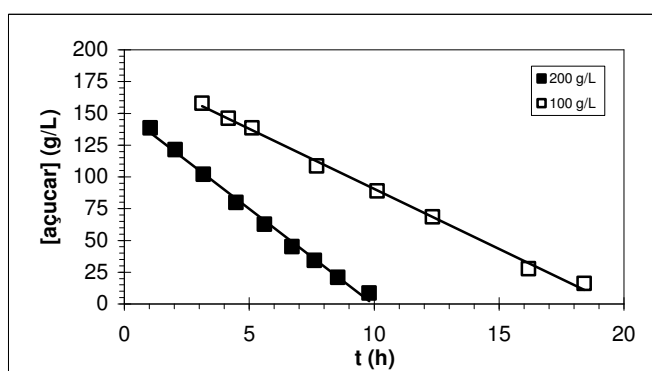
O principal objectivo deste estudo consistiu em avaliar a influência da agitação do meio reaccional na velocidade de consumo dos açúcares presentes no mosto (glucose e frutose) por fermentação com leveduras imobilizadas em alginato, por comparação com os resultados obtidos nos ensaios sem agitação do meio.

Neste estudo, foram conduzidos dois processos de fermentação em descontínuo com cargas de 100 g/L e 200 g/L de ProRestart®, com agitação do meio reaccional, à temperatura de 19,5 °C, com concentração inicial de açúcar no mosto de cerca de 200 g/L e volume total de 430 mL. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 12.

Tal como no estudo realizado sem agitação do meio reaccional, também neste estudo se determinou a cinética de fermentação considerando as velocidades iniciais de consumo de açúcares para descrever o perfil de concentrações ao longo do tempo (Figura 13 e Tabela 10).



**Figura 12:** Concentração de açúcares ao longo do tempo na fermentação descontínua de mosto com agitação do meio reaccional, para cargas de ProRestart® de 100 g/L e 200 g/L.



**Figura 13:** Velocidade de consumo de açúcares, para cargas de 100 g/L e 200 g/L de ProRestart®, na fermentação descontínua de mosto com agitação do meio reaccional.

**Tabela 10:** Velocidade de consumo de açúcar na fermentação descontínua de mosto com e sem agitação do meio reaccional, para cargas de ProRestart® de 200 g/L e 100 g/L.

$C_r$ (g/L)	$r_0 \pm \sigma$ (g/L.h)	
	Sem agitação	Com agitação
200	$15 \pm 1$	$15 \pm 1$
100	$7,7 \pm 0,7$	$9,0 \pm 0,5$

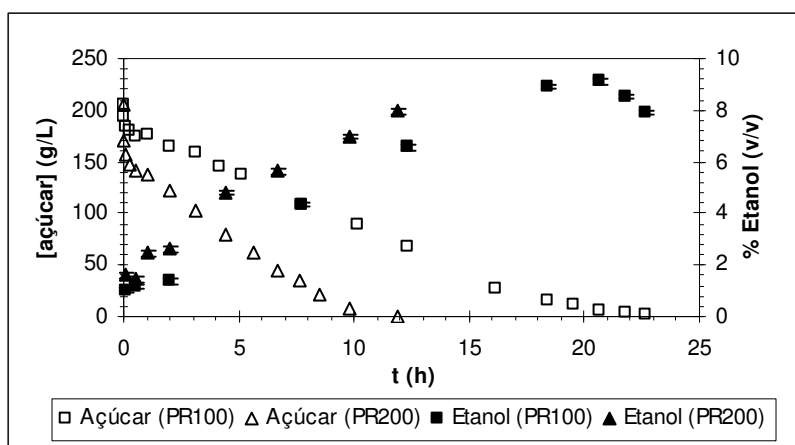
Comparando os resultados da velocidade de consumo dos açúcares observada nos processos de fermentação, com e sem agitação do meio reaccional, verifica-se que não há



diferenças significativas na velocidade de fermentação. Noutros estudos realizados com leveduras imobilizadas em dupla camada de alginato, constatou-se que a agitação do meio melhorou a velocidade de consumo de substrato comparativamente com os ensaios em meio não agitado (Ribeiro, 2008). Deste modo, seria de esperar que a agitação do meio favorecesse a transferência de massa entre o meio líquido e o biocatalisador. Não se tendo verificado diferenças significativas das velocidades de consumo de açúcares na fermentação de mosto com agitação do meio relativamente aos ensaios sem agitação, podem considerar-se duas hipóteses: 1<sup>a</sup>) as limitações difusionais externas associadas ao fenómeno de difusão de açúcar são desprezáveis face ao fenómeno de fermentação nas condições estudadas; 2<sup>a</sup>) a agitação do meio não foi suficiente para minimizar o efeito limitativo da transferência de massa.

#### Formação de Etanol

Relativamente aos ensaios que decorreram com agitação do meio reaccional, quantificou-se também a concentração de etanol presente no meio ao longo do tempo, recorrendo à técnica de HPLC. As amostras foram analisadas em duplicado, pelo que os resultados apresentados (Figura 14) são referentes à média dos valores obtidos na análise.



**Figura 14:** Concentração de açúcar presente no mosto e teor de etanol formado ao longo do tempo na fermentação descontínua de mosto com agitação do meio reaccional, para cargas de ProRestart<sup>®</sup> de 100g/L e 200g/L.

Analisando os resultados apresentados na Figura 14 verifica-se que à medida que o

processo de fermentação decorre, o açúcar vai sendo consumido e o teor de etanol no meio aumenta, o que está de acordo com o esperado.

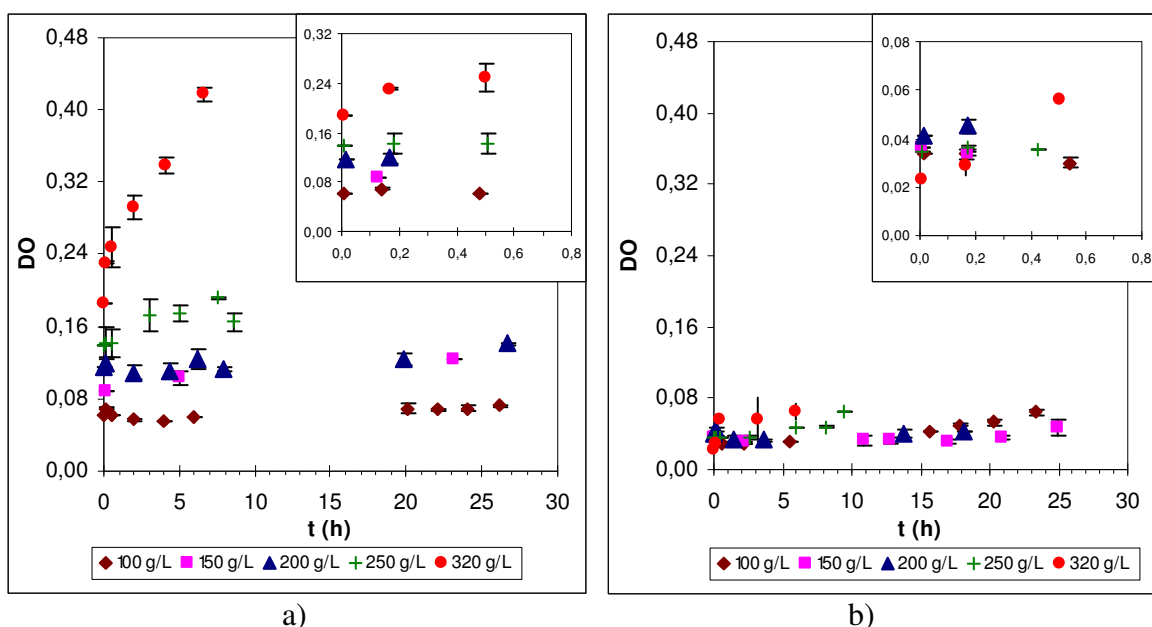
Antes de se iniciar o processo de fermentação, as esferas de alginato são sujeitas a um processo de re-hidratação, já descrito anteriormente. Durante a re-hidratação há formação de etanol, o que pode explicar a presença de etanol nos momentos iniciais nos ensaios de fermentação. No final da fermentação verifica-se um teor de etanol de cerca de 8% no ensaio com carga de esferas de 200 g/L e de 9% no ensaio com carga de esferas de 100 g/L. Contudo o teor de etanol observado no final da fermentação não corresponde à quantidade produzida pela acção das leveduras imobilizadas na conversão dos açúcares presentes no mosto. No início do processo já existia uma pequena quantidade de etanol de cerca de 1% para a carga de esferas de 100 g/L e 1,5% para a carga de esferas de 200 g/L. Deste modo, a quantidade de etanol efectivamente produzida pela fermentação dos açúcares presentes no mosto para os ensaios com cargas de esferas de 100 g/L e 200 g/L é de aproximadamente 8% e 6,5%, respectivamente. Segundo Cardoso (2007), existe uma relação estipulada entre a produção de etanol e a concentração de açúcares presentes no mosto, ou seja, por cada 17 g/L de açúcar consumido o teor alcoólico aumenta em 1% v/v. Desta forma, com uma concentração de 200 g/L de açúcar no mosto seria de esperar, no final da fermentação, um teor alcoólico de aproximadamente 11% v/v.

Outra constatação curiosa que se verifica é a diminuição da concentração de etanol no ensaio com 100 g/L de ProRestart<sup>®</sup> para concentrações de açúcares abaixo das 5 g/L. Tal facto poderia dever-se ao consumo de etanol por parte das leveduras devido à escassez de substrato. No entanto, para concentrações de açúcar na ordem das 5 g/L, no ensaio com 200 g/L de ProRestart<sup>®</sup> não se verifica desaparecimento de etanol, pelo que esta hipótese não será a mais provável. Por outro lado, poderia pensar-se no fenómeno de evaporação para explicar este comportamento, mas mais uma vez não é coerente com o que ocorre no ensaio com 200 g/L de esferas. A oxidação do etanol a ácido acético é também uma hipótese plausível, no entanto seria necessário realizar um estudo mais aprofundado sobre este fenómeno para determinar qual a razão do comportamento observado relativamente à diminuição da concentração de etanol, quando a concentração de açúcar é inferior a 5 g/L.

#### 4.2.1.1 Crescimento de Células Livres

Uma forma de avaliar o progresso dos processos biológicos, consiste na monitorização das diversas condições que podem influenciar a formação de biomassa ou de produtos. Nos processos que envolvem biocatalisadores imobilizados, um dos aspectos a ter em conta é a libertação de biomassa para o exterior do suporte de imobilização. Inúmeros métodos estão disponíveis para a quantificação da biomassa, podendo ser métodos directos, como a contagem ao microscópio óptico ou métodos indirectos como o método espectrofotométrico. Relativamente a este último método, a concentração celular pode ser determinada pela medição da absorvância, a um determinado comprimento de onda, que será posteriormente correlacionada com a concentração celular, a partir de uma calibração prévia (Ribeiro e Ferreira, 2007).

Nos ensaios, quer sem agitação quer com agitação do meio reaccional, mediu-se a densidade óptica ao longo do tempo, de forma a acompanhar o crescimento de células livres no decorrer da fermentação. Os resultados são apresentados nas Figuras 15 e 16.

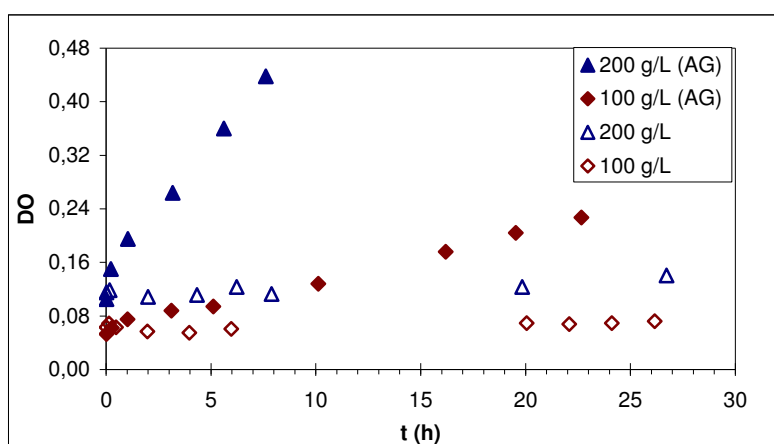


**Figura 15:** Densidade óptica ao longo do tempo para a a) primeira utilização e b) reutilização das esferas nos ensaios em meio não agitado, para diferentes cargas de ProRestart®. (No canto superior direito está representada uma ampliação da zona inicial)

Verifica-se que praticamente só ocorre um aumento significativo da densidade óptica ao longo do tempo para a carga de 320g/L no ensaio em que se utilizaram as esferas pela primeira vez. Tendo em conta que quanto maior é a carga de esferas maior é a probabilidade de haver crescimento de leveduras para o meio envolvente, seria de esperar que para a carga de esferas de 320 g/L a concentração de células livres fosse superior aos outros casos em que se utilizou uma menor carga de esferas.

Nos ensaios de fermentação com reutilização do ProRestart<sup>®</sup> efectuou-se uma lavagem prévia das esferas, procedimento que não foi realizado no caso da primeira utilização. Pelos resultados apresentados na Figura 15a pode verificar-se que nos tempos iniciais, a maior carga está associada a um maior valor da densidade óptica e assim sucessivamente. Por outro lado, no caso da reutilização das esferas com lavagem prévia, figura 15b, este comportamento não é verificado. De facto, durante o processo de imobilização celular poderão ter permanecido algumas leveduras à superfície das esferas apenas depositadas e não imobilizadas no interior da matriz de alginato. Deste modo, o aumento da densidade óptica poderá dever-se apenas ao crescimento de células livres uma vez que estão a ser inoculadas a temperatura apropriada.

Na Figura 16 são apresentados os resultados relativos aos ensaios que decorreram com agitação do meio, onde se evidencia também os resultados obtidos nos ensaios em meio não agitado para melhor comparação.



**Figura 16:** Densidade óptica ao longo do tempo para as cargas de ProRestart<sup>®</sup> de 100g/L e 200g/L, nos ensaios em meio agitado (pontos a cheio) e em meio não agitado (pontos sem preenchimento).

Os resultados obtidos evidenciam a influência da agitação do meio reaccional no crescimento de células para o exterior das esferas de alginato. A existência de agitação no meio leva ao aumento da concentração de células livres de tal forma que para uma carga de 200g/L de esferas em meio agitado, a concentração celular livre é semelhante à observada para uma carga de esferas de 320 g/L em meio não agitado (Figura 15). De facto, a agitação em biorreactores é crucial e pode viabilizar determinados bioprocessos.

Nos ensaios que decorreram sem agitação do meio reaccional, verifica-se que a quantidade de células livres se encontra na gama de  $10^6$  células por mL, em todos os ensaios com excepção do ensaio com carga de ProRestart de 320 g/L onde a concentração de células livres atingiu o valor de  $4 \times 10^7$  células por mL. A concentração de células imobilizadas varia entre  $1 \times 10^8$  células por mL para uma carga de esferas de 100g/L e  $7 \times 10^8$  células por mL para uma carga de esferas de 320 g/L, duas ordens de grandeza de diferença face à concentração de células livres para cargas inferiores a 320 g/L e uma ordem de grandeza de diferença no caso em que se utiliza uma carga de esferas de 320 g/L. Relativamente aos ensaios em meio agitado, a diferença entre a concentração de células livres e a concentração de células imobilizadas é cerca de uma ordem de grandeza. Embora se tenha determinado a concentração de células livres, é necessário ter em conta que a concentração celular no interior do suporte de imobilização não foi medida, sendo apenas calculada com a informação do fornecedor de que existem cerca de  $10^9$  células por grama de esfera seca, o que não permite determinar se houve crescimento celular no interior das esferas.

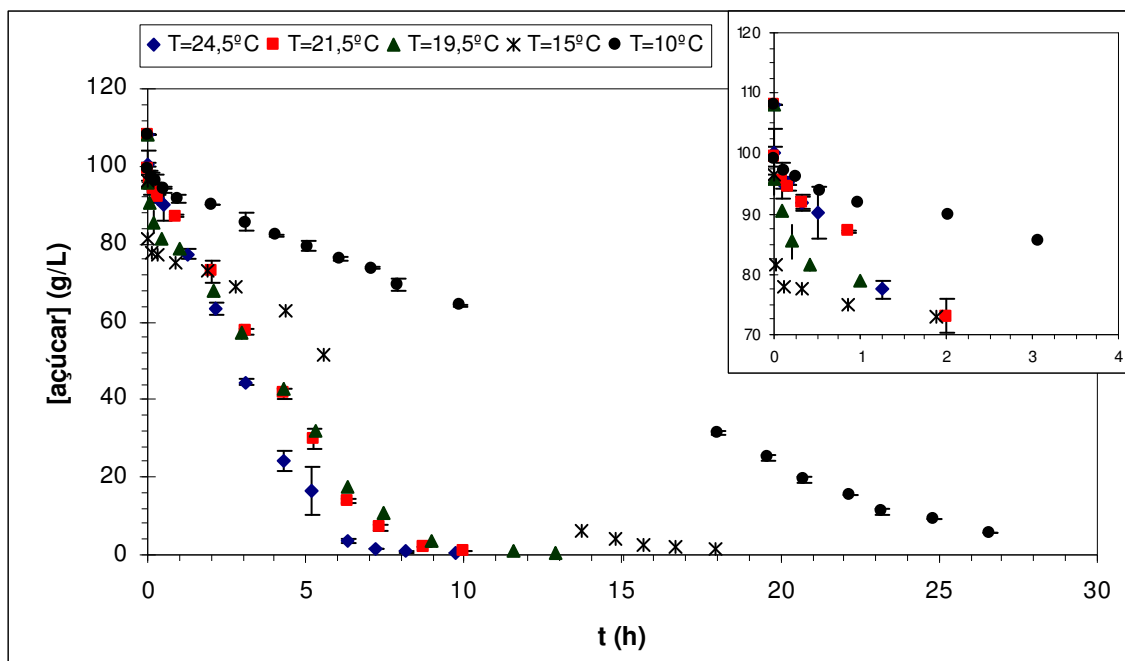
Apesar de em alguns casos a diferença entre a concentração da levedura imobilizada e da levedura livre ser reduzida (uma ordem de grandeza de diferença), todo o estudo foi desenvolvido desprezando a influência de concentração de células livres no meio líquido e portanto desprezando o crescimento celular.

#### **4.2.2 Influência da Temperatura**

Neste estudo realizaram-se ensaios de fermentação descontínua de mosto sem agitação do meio, a diferentes temperaturas na gama [10 - 24,5] °C.

Na Figura 17 são apresentados os resultados obtidos da evolução da concentração

de açúcares com o tempo, para diferentes temperaturas estudadas. Os ensaios foram realizados em duplicado, pelo que os resultados apresentados correspondem a uma média ponderada dos dados obtidos e as barras de erro representam os valores máximo e mínimo medidos.

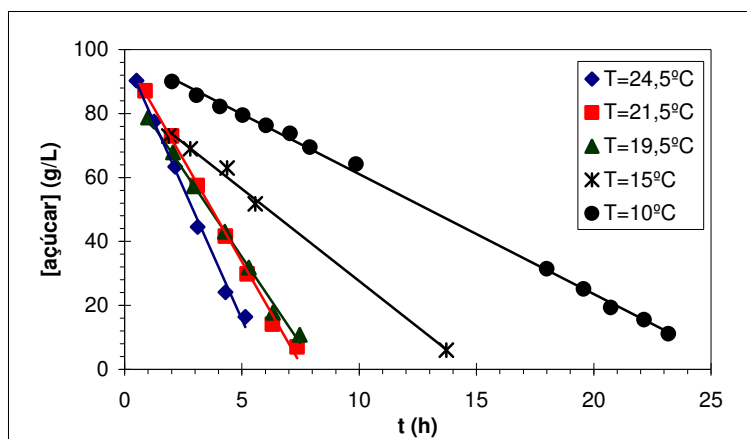


**Figura 17:** Concentração de açúcares ao longo do tempo na fermentação descontínua de mosto, para diferentes temperaturas, utilizando 150 g/L de ProRestart®. (No canto superior direito está representada uma ampliação da zona inicial)

Analisando os resultados experimentais apresentados na Figura 17, verifica-se que a temperatura influencia fortemente a velocidade de consumo de açúcares no processo de fermentação alcoólica, reduzindo o tempo de consumo dos açúcares presentes no mosto. Para uma temperatura de 24,5 °C são necessárias cerca de 8 horas para consumir o açúcar presente no mosto, enquanto que para 10 °C esse tempo é superior a 27 horas.

Nestes ensaios, tal como já se tinha verificado em ensaios anteriores, há um período inicial, de cerca de duas horas, onde a concentração de açúcar diminui abruptamente devido ao fenómeno de difusão já anteriormente explicado (ver 4.2.1).

Para a determinação da velocidade de reacção seguiu-se o procedimento já anteriormente descrito em 4.2.1, por aproximação às velocidades iniciais de consumo de açúcar no processo de fermentação. Na Figura 18 e na Tabela 11 são apresentados os resultados relativos à velocidade de consumo de açúcar para as diferentes temperaturas.



**Figura 18:** Velocidade de consumo de açúcar na fermentação descontínua de mosto, a diferentes temperaturas, para uma carga de ProRestart® de 150 g/L.

**Tabela 11:** Velocidade de consumo de açúcar e respectivo erro associado no processo de fermentação em descontínuo realizado a diferentes temperaturas.

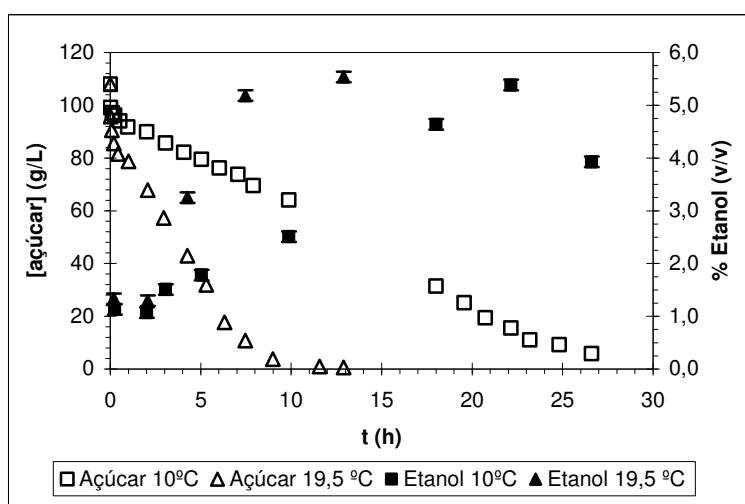
Temperatura (°C)	$r_0 \pm \sigma$ (g/L.h)	Coefficiente de Correlação
24,5	$16 \pm 2$	0,994
21,5	$13 \pm 1$	0,996
19,5	$10,9 \pm 0,8$	0,996
15,0	$5,8 \pm 0,7$	0,996
10,0	$3,8 \pm 0,1$	0,999

Pela análise dos resultados apresentados na Tabela 11, verifica-se que a velocidade de fermentação aumenta com a temperatura. As leveduras apresentam um melhor desempenho fermentativo quando estão em condições de temperatura ótima, assim, quanto mais afastada da temperatura ótima se realizar a fermentação, menor será a velocidade de conversão dos açúcares em etanol.

Este ensaio permite ainda avaliar a influência da concentração inicial de açúcar no mosto na velocidade de fermentação, pois permite comparar as velocidades de consumo de açúcar para uma concentração inicial de açúcar no mosto de 100 g/L (Tabela 11) com a de 200 g/L (Tabela 7) à mesma temperatura (19,5 °C) e mesma carga de esferas (150g/L). Constata-se que esta é superior no caso em que a concentração inicial de açúcar no mosto é de 200 g/L, sendo o seu valor de  $13 \pm 1$  g/L.h e no caso da concentração inicial de açúcar no mosto de 100g/L é de apenas  $10,9 \pm 0,8$  g/L.h. Pode-se concluir que a concentração inicial

de açúcar no mosto também representa um factor determinante da velocidade de reacção em processos fermentativos.

Tal como nos ensaios relativos ao estudo da influência da carga de ProRestart® na fermentação descontínua de mosto com meio agitado, também nestes ensaios se quantificou o etanol formado nos processos de fermentação que decorreram a 19,5 °C e a 10 °C, recorrendo à técnica de HPLC. As amostras foram sujeitas a análise em duplicado, pelo que os resultados apresentados correspondem à média aritmética dos resultados analíticos obtidos e as barras correspondem ao erro associado à média dos resultados experimentais (Figura 19).



**Figura 19:** Concentração de açúcar (pontos sem preenchimento) e teor de etanol formado (pontos a cheio) ao longo do tempo na fermentação descontínua de mosto para as temperaturas de 19,5 °C e 10 °C.

Observando os resultados apresentados na Figura 19 verifica-se que a quantidade de etanol aumenta com o consumo dos açúcares, o que comprova a ocorrência de fermentação alcoólica. Tal como já foi referido anteriormente, antes de iniciar os ensaios de fermentação as leveduras imobilizadas são sujeitas a um processo re-hidratação onde ocorre formação de etanol. Por este motivo, no início dos processos de fermentação já existe uma pequena quantidade de etanol no meio.

Tendo em conta a influência da temperatura na velocidade de consumo de açúcares, facilmente se compreende que esta também influencia a velocidade de formação de etanol.



Embora a velocidade de produção de etanol se altere com a temperatura, a quantidade produzida não é afectada pelo que se pode observar na figura 19, onde se verifica que para ambas as temperaturas estudadas, 10 °C e 19 °C, a quantidade máxima de etanol produzido ronda os 4,2% v/v.

Neste estudo, a concentração inicial de açúcar no mosto é de cerca de 100 g/L sendo por isso esperado obter-se um teor de etanol de 6% v/v segundo a relação estipulada entre a produção de etanol e a concentração de açúcares presentes no mosto referida por Cardoso (2007).

#### 4.2.2.1 Energia de Activação

A energia de activação pode ser estimada segundo a equação de Arrhenius (equação 14) que considera uma variação exponencial da constante cinética com o inverso da temperatura (Shuler e Kargi, 2002).

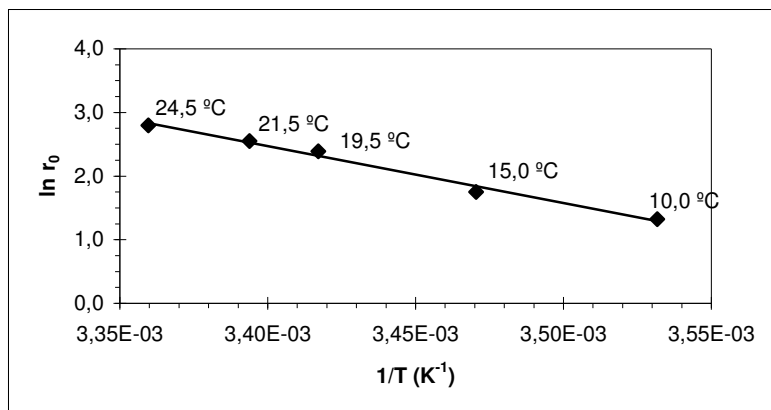
$$k = Ae^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (14)$$

onde k representa a constante cinética ( $\text{h}^{-1}$ ), A o factor pré exponencial,  $E_a$  a energia de activação (cal/mol), R a constante dos gases perfeitos (1,987 cal/mol.K) e T a temperatura (K).

A constante cinética é um parâmetro associado à velocidade de uma reacção que apenas depende da temperatura, podendo, por isso, ser determinada pela velocidade de reacção observada para diferentes temperaturas. Por outro lado, em reacções complexas ou no caso em que não são conhecidos alguns parâmetros essenciais para a determinação de k, é válido estimar a energia de activação considerando a variação exponencial da velocidade de reacção com o inverso da temperatura, já que a sua dependência da temperatura apenas influencia a constante cinética.

$$-\frac{dS}{dt} = r_0 = k[E]_t \quad (15)$$

$$\frac{r_0}{[E]_t} = k = Ae^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (16)$$



**Figura 20:** Linearização da equação de Arrhenius.

A partir do declive da recta foi possível determinar o valor da energia de activação aparente sendo esta de  $(17,8 \pm 0,4)$  kcal/mol para o processo de fermentação em descontínuo com leveduras imobilizadas em esferas de alginato.

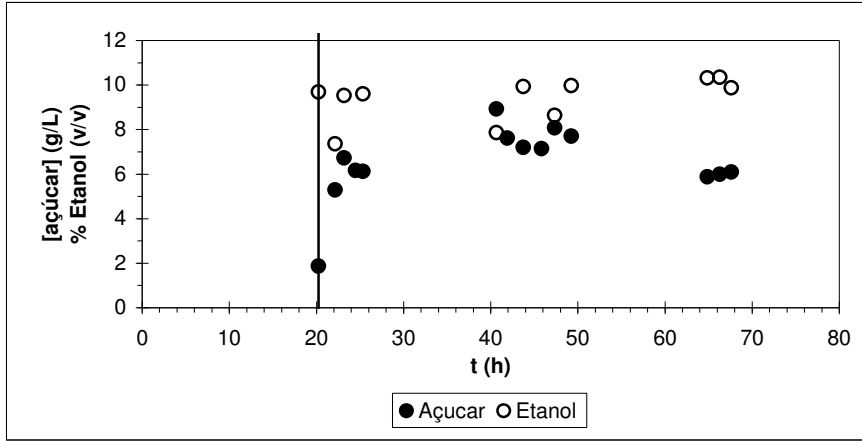
A energia de activação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* livre apresentado na literatura é de 26 kcal/mol (Kandylis e Koutinas, 2008), valor superior ao determinado experimentalmente para a mesma levedura imobilizada em alginato, o que indica a existência de limitações difusionais à transferência de massa (Figueiredo e Ribeiro).

### 4.3 FERMENTAÇÃO EM CONTÍNUO

Com o objectivo de avaliar a possibilidade de implementação de um processo contínuo de fermentação, com leveduras imobilizadas, para a produção de vinho a nível industrial, realizou-se um ensaio utilizando um fermentador de leito fluidizado a operar em contínuo com reciclo do meio líquido. Na Figura 21 são apresentados os resultados obtidos da concentração de açúcar residual e o teor de etanol à saída do reactor, no processo de fermentação em contínuo.

Devido a avaria do equipamento, não foi possível operar o reactor além de 68 horas. No entanto pode-se verificar, observando os resultados apresentados na Figura 21, que o estado estacionário foi atingido, com uma concentração média de açúcar de aproximadamente 7 g/L e um teor de etanol de cerca de 10% (v/v). Bakoyianis *et al* (1997) estudaram o processo de fermentação em contínuo com leveduras imobilizadas em alginato

e apresentam resultados semelhante aos obtidos neste estudo, tendo obtido um teor de etanol de cerca de 12,5% v/v e uma concentração de açúcar residual de 6,5 g/L para um processo a decorrer à temperatura de 20 °C com alimentação de 0,4 mL/min.



**Figura 21:** Concentração de açúcar residual e teor de etanol à saída do fermentador contínuo operado com um caudal de alimentação constante de 0,6 mL/min.

O comportamento de um reactor a operar em contínuo com leito fluidizado com reciclo, pode ser aproximado ao comportamento de um reactor contínuo de tanque agitado (CSTR) quando a razão de reciclo é elevada (Levenspiel, 1974). Atendendo a este facto, o balanço material ao substrato pode ser descrito pela equação 17, quando atingido o estado estacionário.

$$v_f S_f - v_i S_0 + r_{sw} W = 0 \quad (17)$$

onde  $v_i$  e  $v_f$  representam o caudal volumétrico à entrada e à saída do reactor (L/h),  $S_i$  e  $S_f$  as concentrações de açúcar à entrada e saída do reactor (g/L),  $r_{sw}$  a velocidade de consumo de substrato por unidade de massa ( $g_{a\acute{c}}/g_{esf}.h$ ) e  $W$  a massa de esferas (g).

Como o processo decorre a volume constante  $v_f = v_i$ , então

$$r_{sw} = \frac{v(S_0 - S_f)}{W} \quad (18)$$

Na Tabela 12 são apresentados os dados e resultados referentes ao processo de fermentação em contínuo.

**Tabela 12:** Dados e resultados referentes ao processo de fermentação em contínuo.

$W$ ( $g_{\text{esf}}$ )	150
$Q_i$ ( $g_{\text{mosto}}/h$ )	32
$S_0$ ( $g_{\text{ac}}/L$ )	206
$S$ ( $g_{\text{ac}}/L$ )	6,84
$\rho$ ( $g_{\text{mosto}}/L$ )	1076
$r_{\text{sw}}$ ( $g_{\text{ac}}/g_{\text{esf}}.h$ )	0,039

De forma a avaliar o desempenho do processo contínuo compararam-se os resultados com os obtidos no processo descontínuo em que se utilizou uma carga de ProRestart<sup>®</sup> de 150 g/L. A velocidade de consumo de substrato no processo contínuo e no processo descontínuo e o teor de etanol observado em ambos os processos são apresentados na Tabela 13. De modo a poder comparar os dois processos, a velocidade de consumo de substrato apresentada para o processo em descontínuo foi calculada (pela equação de Michaelis-Menten) para uma concentração de substrato de 7 g/L, já que esta é a concentração à saída do fermentador no processo em contínuo. Como o teor de álcool não foi medido no ensaio em descontínuo utilizando uma carga de esferas de 150 g/L assumiu-se que este esteja no intervalo entre [6,5 – 8] % v/v, valores obtidos nos ensaios com cargas de esferas de 100 g/L e 200 g/L.

**Tabela 13:** Velocidade de consumo de substratos no processo contínuo e no descontínuo.

Velocidade de consumo de substrato ( $g_{\text{ac}}/g_{\text{esf}}.h$ )		Teor de etanol (% v/v)	
Contínuo	Descontínuo	Contínuo	Descontínuo
0,039	0,014	10	[6,5-8]

Com base nos resultados apresentados na Tabela 13 verifica-se que a velocidade de consumo de substrato no processo contínuo é cerca de três vezes superior à observada no processo em descontínuo, tal como o teor de etanol que é também superior no processo contínuo. Desta forma, pode-se considerar que o processo em contínuo apresenta uma maior eficiência quer na velocidade de consumo de substrato quer na produção de etanol, o

que está de acordo com Bakoyianis *et al.* (1997). De acordo com o que foi descrito, pode-se concluir que, do ponto de vista processual, o processo contínuo estudado é mais eficiente que o processo em descontínuo.

#### 4.4 ESTUDO DE VIABILIDADE ECONÓMICA

Efectuou-se um pré-estudo de viabilidade económica do processo de fermentação contínua de mosto tendo em conta as condições determinadas experimentalmente. Determinou-se o custo do produto ProRestart<sup>®</sup> por unidade de volume de vinho produzido comparando-se este com o custo da levedura seca activa (dado fornecido pela Proenol).

Considerando uma vindima de 40 dias, para fermentar 2000 L de mosto por hora, com uma velocidade de consumo de açúcar de  $0,04 \text{ g}_{\text{aç}}/\text{g}_{\text{esf}}\cdot\text{h}$ , o custo de produção de vinho com levedura imobilizada é 37 vezes superior ao custo de produção com levedura seca activa. Nestas mesmas condições, seria necessário um fermentador com um volume de  $66,7 \text{ m}^3$ . Mantendo a mesma relação entre a altura e o diâmetro do fermentador utilizado à escala laboratorial, seria necessário um fermentador com uma altura de 23,7 m e diâmetro de 1,9 m para operar à escala industrial. Com estas condições, o processo não é viável à escala industrial nem do ponto de vista económico nem do ponto de vista tecnológico dadas as dimensões do fermentador.

De modo a tornar o processo economicamente viável à escala industrial seria necessário alterar as condições de fermentação para aumentar a velocidade de consumo de açúcar. Determinou-se que para uma velocidade de consumo de açúcar superior a  $1 \text{ g}_{\text{aç}}/\text{g}_{\text{esf}}\cdot\text{h}$  o processo torna-se economicamente viável, do ponto de vista do custo da levedura imobilizada, para fermentar 2000 L de mosto por hora durante 40 dias. Nestas condições seria necessário um fermentador com volume de  $2,7 \text{ m}^3$  com altura de 8,1 m e diâmetro de 0,65 m. Desta forma, o processo torna-se economicamente viável, no entanto seria necessário um estudo do processo mais aprofundado de modo a determinar o comportamento de um fermentador destas dimensões e considerar para o estudo económico todos os custos associados quer à operação quer ao investimento.

## 5 CONCLUSÕES E PROPOSTAS DE TRABALHO FUTURO

### 5.1 CONCLUSÕES

O presente estudo comprovou que é possível produzir etanol por fermentação alcoólica utilizando leveduras *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em esferas de alginato, produto designado comercialmente por ProRestart<sup>®</sup>.

De modo a avaliar a influência de determinados parâmetros na fermentação alcoólica de mosto com leveduras imobilizadas estudou-se o processo em descontínuo tendo-se concluído que:

- A carga de biocatalisador influencia a velocidade de consumo dos açúcares presentes no mosto: o aumento da carga de leveduras imobilizadas resulta no aumento da velocidade de consumo de açúcares;
- A reutilização da levedura imobilizada para uma segunda fermentação e a agitação do meio não têm influência significativa na velocidade de consumo de açúcares, nas condições estudadas;
- A fermentação de mosto com leveduras imobilizadas em alginato segue o modelo cinético de Michaelis-Menten, uma vez que estas leveduras realizam a fermentação alcoólica através de enzimas.
- A concentração inicial de açúcar no mosto influencia a velocidade de consumo de açúcar;
- A temperatura influencia fortemente a velocidade de consumo de açúcares no processo de fermentação alcoólica: o aumento da temperatura reduz o tempo de consumo dos açúcares presentes no mosto;
- A energia de activação determinada para a fermentação descontínua de mosto com leveduras imobilizadas em alginato é de  $17,8 \pm 0,4$  kcal/mol, valor inferior ao apresentado na literatura para a levedura livre (26 kcal/mol).

Paralelamente ao estudo de fermentação descontínua de mosto, realizou-se um estudo de difusão de açúcar para o interior das esferas. Neste estudo pretendia-se determinar a causa do rápido decréscimo da concentração de açúcar nos instantes iniciais

em processos de fermentação com ProRestart<sup>®</sup>. Concluiu-se que:

- A diminuição da concentração de açúcar no início da fermentação com ProRestart<sup>®</sup> deve-se à difusão dos açúcares para o interior das esferas e não à sua conversão em etanol e dióxido de carbono.
- O aumento da carga de esferas resulta na diminuição da quantidade de açúcar que se difunde para o seu interior;
- O fenómeno de difusão de açúcar em esferas de alginato segue uma cinética de pseudo 2<sup>a</sup> ordem.

Relativamente ao estudo de fermentação contínua de mosto, os resultados obtidos permitiram concluir que é possível realizar fermentação alcoólica de mosto com leveduras imobilizadas em alginato por um processo contínuo e que este apresenta vantagens relativamente ao processo descontínuo. Concluiu-se que tanto o teor de etanol formado (10% v/v) como a velocidade de consumo de substrato são superiores no processo contínuo relativamente ao processo descontínuo, sendo a velocidade de consumo de açúcares cerca de três vezes superior à observada no processo descontínuo.

Um pré-estudo de viabilidade económica foi realizado com o intuito de avaliar a possibilidade de implementação do processo contínuo à escala industrial para a produção de vinho. Neste estudo, concluiu-se que nas condições estudadas o processo não é viável à escala industrial nem do ponto de vista económico nem do ponto de vista tecnológico, sendo o custo de produção de vinho com levedura imobilizada 37 vezes superior ao custo de produção com levedura seca activa. Conclui-se ainda com este estudo que para uma velocidade de consumo de açúcar superior a  $1 \text{ g}_{\text{aç}}/\text{g}_{\text{esf}}\cdot\text{h}$  o processo torna-se economicamente viável, do ponto de vista do custo do biocatalisador.

## 5.2 PROPOSTAS DE TRABALHO FUTURO

No decorrer deste trabalho surgiram algumas questões cuja compreensão só é possível mediante a realização de outros estudos.

Tanto no estudo de difusão como no estudo de fermentação descontínua de mosto surgiram algumas dificuldades na interpretação dos resultados devido ao facto de se variarem diversos factores em simultâneo. Nestes ensaios, variou-se a carga de levedura

imobilizada mantendo constante o volume total (levedura imobilizada e mosto) o que resultou numa variação do volume de mosto e consequentemente da concentração de açúcar em cada ensaio com diferentes cargas de ProRestart<sup>®</sup>. De forma a permitir compreender melhor os fenómenos de difusão e fermentação com leveduras imobilizadas teria sido mais vantajoso realizar os ensaios mantendo fixo o volume de mosto e não o volume total.

Em relação aos ensaios de fermentação descontínua de mosto, estudou-se a influência da reutilização das esferas para uma segunda fermentação. O estudo de reutilização das esferas poderia ser realizado para fermentações consecutivas com simultâneo acompanhamento da viabilidade celular no interior das esferas, de modo a determinar a capacidade fermentativa das células imobilizadas ao longo de fermentações sucessivas.

Uma das questões que mais dúvidas suscitou prende-se com o facto de dois processos em simultâneo influenciarem os resultados, nomeadamente a difusão e a fermentação. Em todos os ensaios de fermentação realizados mediu-se a concentração de açúcares e em alguns o etanol presente no mosto, contudo nunca se determinou a concentração de açúcar e etanol no interior das esferas. Seria interessante realizar um estudo mais aprofundado sobre a concentração de açúcar e etanol existente no interior das esferas de modo a permitir determinar se as limitações difusionais internas à transferência de massa (produto e substrato) poderão estar a influenciar o processo.

Relativamente ao estudo de fermentação contínua de mosto com leveduras imobilizadas em alginato, seria interessante explorar outras condições, tais como diferentes temperaturas, cargas de biocatalisador e caudal de alimentação de forma a determinar as condições óptimas de fermentação que maximizam a velocidade de consumo de açúcar e consequentemente tornem o processo viável economicamente.

Outro factor de relevante importância na fermentação é o biocatalisador imobilizado, pelo que se torna pertinente estudar diferentes condições de imobilização da levedura (diâmetro das esferas e concentração de levedura por unidade mássica de esferas) o que poderia melhorar a velocidade de fermentação.

Em ambos os processos, contínuo e descontínuo seria interessante realizar um estudo com células livres para comparação com os ensaios com levedura imobilizada. Embora no processo descontínuo fosse simples realizar este estudo, no processo contínuo



seria necessário fazer algumas alterações ao reactor de forma a impedir a saída das células livres.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abu Al-Rub, F. A., El-Nass, M.H., Benyahia, F., Ashour, I. (2004). "Biosorption of nickel on blank alginate beads, free and immobilized algal cells", *Process Biochemistry* 39: 1767-1773.

(Disponível em URL: [http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=MImg&\\_imagekey=B6THB-4B0SVF8-1-17&\\_cdi=5278&\\_user=8058641&\\_orig=search&\\_coverDate=07%2F30%2F2004&\\_sk=999609988&view=c&wchp=dGLzVzz-zSkWb&md5=0320443f6d15e48288a98920ffc13159&ie=/sdarticle.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MImg&_imagekey=B6THB-4B0SVF8-1-17&_cdi=5278&_user=8058641&_orig=search&_coverDate=07%2F30%2F2004&_sk=999609988&view=c&wchp=dGLzVzz-zSkWb&md5=0320443f6d15e48288a98920ffc13159&ie=/sdarticle.pdf) consultado em Janeiro de 2008)

Aires-Barros, M. R., Fernandes, P. (2003). Imobilização de Biocatalisadores In *Engenharia Enzimática*, Cabral, J., Aires-Barros, M. R., Gama, M. Lisboa, Lidel: 121-140.

Bakoyianis, V., Koutinas, A. A. (1996). "A Catalytic Multistage Fixed-Bed Tower Bioreactor in an Industrial-Scale Pilot Plant for Alcohol Production", *Biotechnology and Bioengineering* 49: 197-203.

(Disponível em URL: <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/71002934/PDFSTART> consultado em Outubro de 2008)

Bakoyianis, V., Koutinas, A. A., Agelopoulos, K., Kanellaki, M. (1997). "Comparative Study of Kissiris,  $\gamma$ -Alumina, and Calcium Alginate as Supports of Cells for Batch and Continuous Wine-Making at Low Temperatures", *Agricultural and Food Chemistry* 45(12): 4884-4888.

(Disponível em URL: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf970192q> consultado em Outubro de 2008)

Baptista, C., Cóias, J., Oliveira, A., Oliveira, N., Rocha, J., Dempsey, M. J., Lannigan, K. C., Benson, P. S. (2006). "Natural Immobilization of Microorganisms for Continuous Ethanol Production", *Enzyme and Microbial Technology* 40: 127-131.

(Disponível em URL: [http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=MImg&\\_imagekey=B6TG1-4K3CKGW-6-F&\\_cdi=5241&\\_user=8058641&\\_orig=search&\\_coverDate=12%2F2006](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MImg&_imagekey=B6TG1-4K3CKGW-6-F&_cdi=5241&_user=8058641&_orig=search&_coverDate=12%2F2006)

[2F06%2F2006&\\_sk=999599998&view=c&wchp=dGLzVlz-zSkWA&md5=ab6f63abfef167ead32a2c6420eefaf5&ie=/sdarticle.pdf](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926641008000167) consultado em Abril de 2009)

Baptista, C., Cóias, J., Oliveira, A., Rocha, J. (2007). Immobilisation of Yeasts for Continuous Fermentation In Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology, Méndez-Vilas, A., vol. 2, Formatex: 418-425. Badajoz (Disponível em URL: <http://www.formatex.org/microbio/pdf/Pages418-425.pdf> consultado em Abril de 2009)

Boulton, R., Singleton, V., Bisson, L., Kunkee, R. (1999). Principles and Practices of Winemaking, Springer, New York.

Cardoso, A. D. (2007). O Vinho - da Uva à Garrafa, Âncora Editora.

Carvalho, A. C. (2007). Análise de Processos de Microvinificação da Cultivar Cabernet sauvignon por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Espectroscopia na Região do Infravermelho (FT-IR) e Quimiometria. Tese de Mestrado. Curitiba, Universidade Federal do Paraná.

(Disponível em URL: <http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/1884/14440/1/Disserta%C3%A7%C3%A3o.pdf> consultado em Outubro de 2008)

Carvalho, W., Canilha, L., Silva, S. S. (2006). "Uso de Biocatalisadores Imobilizados: Uma Alternativa para a Condução de Bioprocessos", Revista Analytica **23**: 60-70.

(Disponível em URL: [http://www.revistaanalytica.com.br/analytica/ed\\_anteriores/23/art02.pdf](http://www.revistaanalytica.com.br/analytica/ed_anteriores/23/art02.pdf) consultado em Outubro de 2008)

Dalla-Vicchia, R., Nascimento, M. G., Valdir, S. (2004). "Aplicações Sintéticas de Lipases Imobilizadas em Polímeros", Química Nova **27**(4): 623-630.

(Disponível em URL: <http://quimicanova.sbq.org.br/qn/qnol/2004/vol27n4/16-RV03143.pdf> consultado em Maio de 2009)

Deák, T. (2007). Handbook of Food Spoilage Yeasts, 2nd Ed, CRC Press.

Fernandes, P., Aires-Barros, M.R., Cabral, J.M.S. (2003). Biocatálise Aplicada In Biotecnologia: Fundamentos e Aplicações, Lima, N., Mota, M., Lidel: 219-246, Lisboa-Porto.

Ferreira, E. C., Teixeira, J. A. (2003). Biorreactores In Biotecnologia: Fundamentos e Aplicações, Lima, N., Mota, M., Lidel: 165-194, Lisboa-Porto.

Figueiredo, J. L., Ribeiro, F. R. (2007). Catálise Heterogénia, 2ª Ed., Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.

Fleet, G., Bonnett, R. (1993). Wine Microbiology and Biotechnology, Taylor & Francis, Inc., New York.

Fogler, H. S. (1999). Elements of Chemical Reaction Engineering, 3rd Ed, Prentice-Hall PTR, New Jersey.

Fonseca, A., Madeira-Lopes, A. (2003). Biodiversidade In Biotecnologia: Fundamentos e Aplicações, Lima, N., Mota, M., Lidel: 3-31, Lisboa-Porto.

Fonseca, M. M. (2007). Estequiometria e Cinética dos Processos Microbianos In Reactores Biológicos: Fundamentos e Aplicações, Fonseca, M. M., Teixeira, J. A., Lidel: 3-26, Lisboa-Porto.

FT155-04. "[http://proenol.pt/files/products/ProRestart\\_FT155-04.pdf](http://proenol.pt/files/products/ProRestart_FT155-04.pdf)." Consultado em Maio de 2009.

García, V. (2004). Introducción a la Microbiología. 2nd Ed., EUNED, Costa Rica.

Gardiner, W. (1997). Statistical Analysis Methods for Chemists: A Software-based Approach Cambridge, The Royal Society of Chemistry.

Gilson, C., Thomas, A. (1995). "Ethanol Production by Alginate Immobilized Yeast in a

Fluidised Bed Bioreactor", *Chemistry Technology and Biotechnology* 62: 38-45.

Guimarães, T. M. (2005). Isolamento, Identificação e Seleção de Cepas de Levedura *Saccharomyces cerevisiae* para Elaboração de Vinho. Tese de Mestrado. Curitiba, Universidade Federal do Paraná.

Gyamerah, M., Glover, J. (1996). "Production of Ethanol by Continuous Fermentation and Liquid-Liquid Extraction", *Chemistry Technology and Biotechnology* 66: 145-152.

Jackson, R. (2008). *Wine Science: Principles and Applications*, 3rd Ed., Academic Press.

Jiang, H., Xu, Y., Zhang, J., Zhang, L., Han, R. (2007). "Pseudo second order kinetics model for the biosorption of lead onto waste yeast: a comparison of linear and nonlinear methods and error analysis", *Life Science Journal* 4(4): 42-45.

(Disponível em URL: [life.zzu.edu.cn/iftedownload.asp?idc=587](http://life.zzu.edu.cn/iftedownload.asp?idc=587) consultado em Janeiro de 2009)

Kandylis, P., Koutinas, A. (2008). "Extremely Low Temperature Fermentations of Grape Must by Potato-Supported Yeast, Strain AXAZ-1. A Contribution Is Performed for Catalysis of Alcoholic Fermentation", *Agricultural and Food Chemistry* 56(9): 3317-3327.

(Disponível em URL: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf073273n> consultado em Abril de 2008)

Kourkoutas, Y., Kanellaki, M., Koutinas, A., Tzia, C. (2005). "Effect of Fermentation Conditions and Immobilization Supports on the Wine Making", *Journal of Food Engineering* 69: 115-123.

(Disponível em URL: [http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=MIimg&\\_imagekey=B6T8J-4DFT3RB-5-1&cdi=5088&user=8058641&orig=search&coverDate=07%2F01%2F2005&sk=999309998&view=c&wchp=dGLbVzb-zSkzS&md5=e60e2f6b6bea6448ba1eca1229555870&ie=/sdarticle.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6T8J-4DFT3RB-5-1&cdi=5088&user=8058641&orig=search&coverDate=07%2F01%2F2005&sk=999309998&view=c&wchp=dGLbVzb-zSkzS&md5=e60e2f6b6bea6448ba1eca1229555870&ie=/sdarticle.pdf) consultado em Outubro de 2008)

Koutinas, A. A., Bakoyianis, V., Argiriou, T., Kanellaki, M., Voliotis, S. (1997). "A

Qualitative Outline to Industrialize Alcohol Production by Catalytic Multistage Fixed Bed Tower (MFBT) Bioreactor", *Applied Biochemistry and Biotechnology* 66(2): 121-131.

Levenspiel, O. (1974). *Engenharia das Reacções Químicas: Cálculo de Reactores*, 2ª Ed., Edgard Bluchher Ltda, São Paulo – Brasil.

Lothar, A. M. (1999). Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* and *Leuconostoc oenus* for Alcoholic and Malolactic Fermentation in Continuous Wine Making. Tese de Doutorado. Georgia, University of Georgia.

(Disponível em URL: [http://tede.ibict.br/tde\\_busca/arquivo.php?codArquivo=293](http://tede.ibict.br/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=293) consultado em Dezembro de 2008)

Loukatos, P., Kanellaki, M., Komaitis, M., Athanasiadis, I., Koutinas, A. A. (2003). "A New Technological Approach Proposed for Distillate Production using immobilized cells", *Journal of Bioscience and Bioengineering* 95(1): 35-39.

(Disponível em URL: [http://www.jstage.jst.go.jp/article/jbb/95/1/35/\\_pdf](http://www.jstage.jst.go.jp/article/jbb/95/1/35/_pdf) consultado em Outubro de 2008)

Macedo, A., Venâncio, A., Malcata, F. (2003). *Biotechnologia dos Alimentos In Biotechnologia: Fundamentos e Aplicações*, Lima, N., Mota, M., Lidel: 429-472, Lisboa-Porto.

McGhee, J., Julian, G., Detroy, R. (1982). "Continuous and Static Fermentation of Glucose to Ethanol by Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* Cells of Different Ages", *Applied and Environmental Microbiology* 44(1): 19-22.

(Disponível em URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=241961&blobtype=pdf> consultado em Outubro de 2008)

Nedovic, V., Willaert, R. (2005). *Applications of Cell Immobilization Biotechnology*, Springer, Dordrecht.

Nguyen, V., Shieh, W. (1992). "Continuous Ethanol Fermentation Using Immobilized

Yeast in a Fluidized Bed Reactor", *Chemistry Technology and Biotechnology* 55: 339-346.

Nielsen, J., Villadsen, J. (1994). *Bioreaction Engineering Principles*, Plenum Press, New York

Peynaud, E., Spencer, A. (1984). *Knowing and Making Wine*, Wiley-Interscience, New York.

Pretorius, I., Toit, M., Rensburg, P. (2003). "Designer Yeasts for the Fermentation Industry of the 21<sup>st</sup> Century", *Food Technology and Biotechnology* 41(1): 3-10.

(Disponível em URL: <http://www.ftb.com.hr/41-3.pdf> consultado em Maio de 2009)

Ramakrishna, S., Prakasham, R. (1999). "Microbial Fermentations with Immobilized Cells", *Current Science* 77: 87-100.

(Disponível em URL: <http://www.ias.ac.in/currsci/jul10/articles17.htm> consultado em Maio de 2009)

Ribeiro, M., Ferreira B. (2007). *Medição das Variáveis Principais In Reactores Biológicos: Fundamentos e Aplicações*. Fonseca, M. M., Teixeira, J. A., Lidel: 153-172, Lisboa-Porto.

Ribeiro, S. (2008). *Desacidificação biológica de mostos e vinhos com Schizosaccharomyces pombe*. Tese de Mestrado. Aveiro, Universidade de Aveiro.

Richter, P., Ruiz, B. L., Cabezudo, S., Mottola, H. A. (1996). "Immobilized Enzyme Reactors. Difusion/Convection, Kinetics, and a Comparison of Packed-Column and Rotating Bioreactors for Use in Continuous-Flow Systems", *Analytical Chemistry* 68(10): 1701-1705.

(Disponível em URL: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac950910c> consultado em Maio de 2009)

Shuler, M., Kargi, F. (2002). Bioprocess Engineering: Basic Concepts, 2nd Ed., Prentice-Hall PTR, New Jersey.

Silva, S., Portugal, F. R., Andrade, P., Abreu, S., Teixeira, M. F., Strehaiano, P. (2003). "Malic Acid Consumption by Dry Immobilized Cells of *Schizosaccharomyces pombe*." American Journal of Enology and Viticulture 54(1): 50-55.

Sipsas, V., Kolokythas, G., Kourkoutas, Y., Plessas, S., Nedovic, V., Kanellaki, M. (2009). "Comparative Study of Batch and Continuous MFBT Bioreactor During Wine-Making Using Freeze-Dried Immobilized Cells", Journal of Food Engineering 90: 495-503.

(Disponível em URL: [http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=MImg&\\_imagekey=B6T8J-4T3M631-1-5&\\_cdi=5088&\\_user=8058641&\\_orig=search&\\_coverDate=02%2F28%2F2009&\\_sk=999099995&view=c&wchp=dGLzVzz-zSkWA&md5=34fbbbe4d0e2823cb21532babeed824c&ie=/sdarticle.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MImg&_imagekey=B6T8J-4T3M631-1-5&_cdi=5088&_user=8058641&_orig=search&_coverDate=02%2F28%2F2009&_sk=999099995&view=c&wchp=dGLzVzz-zSkWA&md5=34fbbbe4d0e2823cb21532babeed824c&ie=/sdarticle.pdf) consultado em Outubro de 2008)

Spencer-Martins, I., Sá-Nogueira, I. (2003). Biotecnologia Microbiana In Biotecnologia: Fundamentos e Aplicações. Lima, N., Mota, M., Lidel: 249-265, Lisboa-Porto.

Takaya, M., Motsumoto, N., Yanase, H. (2002). "Characterization of Membrane Bioreactor of Dry Wine Production", Journal of Bioscience and Bioengineering 93(2): 240-244.

Teixeira, J. A., Fonseca, M. M., Vicente, A. A. (2007). Geometrias e Modos de Operação In Reactores Biológicos: Fundamentos e Aplicações, Fonseca, M. M., Teixeira, J. A., Lidel: 27-68, Lisboa-Porto.

Zimmermann, F., Entian, K. (1997). Yeast Sugar Metabolism: Biochemistry, Genetics, Biotechnology and Applications, Technomic Publishing Company, Inc., Pennsylvania.



## ANEXOS

### ANEXO A: Difusão de Açúcares

**Tabela A.1:** Dados referentes ao ensaio de difusão de açúcares para o interior das esferas, para diferentes cargas de ProRestart.

320		200		150		100	
t (min)	[açúcar] (g/L)	t (min)	[açúcar] (g/L)	t (min)	[açúcar] (g/L)	t (min)	[açúcar] (g/L)
0,00	194,50	0,00	194,50	0,00	194,50	0,00	194,50
1,83	99,00	0,13	163,50	0,27	180,50	0,18	183,50
2,08	95,00	1,13	152,00	1,08	164,00	0,67	172,00
3,08	90,00	2,10	146,00	2,03	159,50	1,20	172,00
4,13	85,00	3,10	141,50	3,00	154,00	1,75	188,50
5,18	88,50	4,17	142,00	4,02	151,00	2,70	170,50
6,27	85,50	5,07	138,50	5,08	140,50	3,73	171,00
7,33	89,00	6,03	142,00	6,00	148,50	4,93	165,50
8,23	89,50	7,07	139,00	7,00	145,50	5,95	160,50
9,23	88,00	8,00	135,50	8,05	148,50	7,00	164,50
10,40	89,50	9,00	136,50	9,02	142,00	7,98	158,00
15,07	83,00	10,03	137,50	10,02	143,00	9,02	160,00
20,37	83,50	15,20	132,00	15,02	111,00	10,08	161,00
25,20	84,50	20,00	133,00	20,58	147,50	15,50	160,00
30,25	85,00	25,00	130,50	25,08	135,00	19,98	160,50
35,00	85,00	30,00	134,00	30,08	136,00	24,93	162,50
40,13	84,50	35,05	135,50	35,82	138,00	29,03	158,00
45,07	87,00	40,40	137,00	40,10	145,00	35,18	163,00
50,03	85,50	45,00	139,50	45,07	144,00	41,40	164,50
55,50	85,50	50,78	135,00	50,08	148,50	45,03	161,50
60,18	84,50	55,20	135,00	55,13	143,50	50,08	146,00
-	-	60,50	129,50	60,13	143,00	55,27	155,50

## ANEXO B: Fermentação Descontínua de Mosto sem Agitação do Meio

**Tabela B.1:** Dados referentes à primeira utilização e reutilização das esferas de ProRestart® com carga de 100 g/L, na fermentação descontínua de mosto sem agitação do meio.

	Original			Duplicado		
	t (h)	[açúcar] (g/L)	DO	t (h)	[açúcar] (g/L)	DO
<b>1ª Fermentação</b>	0,00	207,00	0,035	0,00	207,00	0,035
	0,01	199,00	0,064	0,01	199,50	0,062
	0,07	207,50	-	0,08	206,00	-
	0,14	204,00	0,069	0,14	203,00	0,069
	0,24	202,00	-	0,24	199,50	-
	0,48	188,00	0,064	0,48	191,50	0,062
	0,83	195,00	-	0,83	197,00	-
	1,97	178,50	0,057	1,97	185,50	0,057
	2,98	180,50	-	2,98	181,50	-
	3,97	165,00	0,055	3,97	180,50	0,055
	5,10	170,50	-	5,10	172,00	-
	5,97	155,50	0,057	5,97	149,50	0,064
	19,07	39,30	-	19,05	45,40	-
	20,05	37,62	0,070	20,05	39,62	0,069
	21,15	31,18	-	21,15	32,92	-
	22,08	25,50	0,066	22,08	27,00	0,070
	23,17	20,10	-	23,17	21,40	-
	24,12	13,60	0,069	24,12	14,90	0,070
	25,12	9,20	-	25,12	10,60	-
	26,15	7,25	0,071	26,15	7,25	0,073
<b>Reutilização</b>	0,00	207,00	0,035	0,00	207,00	0,035
	0,01	188,00	0,035	0,01	182,50	0,032
	0,09	175,50	-	0,09	180,50	-
	0,17	174,50	0,035	0,17	177,00	0,032
	0,25	169,50	-	0,25	176,00	-
	0,54	167,50	0,030	0,54	166,50	0,030
	0,99	163,00	-	0,99	167,50	-
	2,15	157,00	0,03	2,15	158,00	0,030
	3,35	146,50	-	3,35	149,50	-
	5,57	122,50	0,031	5,53	122,50	0,031
	7,07	106,00	-	7,03	111,00	-
	15,63	21,00	0,043	15,63	26,25	0,041
	16,73	14,25	-	16,73	15,25	-
	17,77	8,47	0,048	17,77	9,35	0,052
	18,78	5,83	-	18,78	5,83	-
	20,32	2,68	0,051	20,32	2,70	0,055
	21,87	1,50	-	21,87	1,48	-
	23,40	0,96	0,050	23,40	0,96	0,08

**Tabela B.2:** Dados referentes à primeira utilização e reutilização das esferas de ProRestart® com carga de 150 g/L, na fermentação descontínua de mosto sem agitação do meio.

	Original			Duplicado		
	t (h)	[açúcar] (g/L)	DO	t (h)	[açúcar] (g/L)	DO
<b>1ª Fermentação</b>	0,00	207,00	0,035	0,00	207,00	0,035
	0,01	175,00	-	0,01	177,50	-
	0,03	175,00	-	0,03	169,00	-
	0,04	175,00	-	0,04	169,50	-
	0,06	171,00	-	0,06	166,50	-
	0,08	172,00	-	0,08	167,00	-
	0,10	163,50	-	0,10	162,00	-
	0,11	181,50	-	0,11	187,20	-
	0,13	174,00	0,083	0,13	161,00	0,094
	0,15	163,50	-	0,15	158,00	-
	0,16	164,00	-	0,16	155,50	-
	0,52	159,50	-	0,50	150,50	-
	1,55	145,50	-	1,55	139,00	-
	2,53	141,00	-	2,53	136,50	-
	3,93	122,00	-	3,93	116,50	-
	5,03	103,00	0,103	5,05	102,00	0,103
	6,12	88,50	-	6,12	89,50	-
	7,07	80,25	-	7,07	80,75	-
	7,88	65,50	-	7,88	69,00	-
	23,15	0,16	0,116	23,15	0,18	0,132
	24,13	0,09	-	24,27	0,11	-
	25,50	0,04	-	25,50	0,06	-
	27,67	0,01	-	27,67	0,03	-
	28,85	0,00	-	28,85	0,00	-
<b>Reutilização</b>	0,00	207,00	0,035	0,00	207,00	0,035
	0,01	193,00	0,037	0,01	185,00	0,035
	0,09	164,00	0,034	0,09	164,50	0,029
	0,17	158,50	0,033	0,17	162,00	0,035
	0,88	141,00	0,038	0,88	144,00	0,028
	2,23	126,50	0,035	2,25	133,00	0,027
	3,27	115,50	0,028	3,18	119,00	0,028
	10,82	38,30	0,031	10,82	45,00	0,035
	11,90	32,80	0,034	11,90	38,80	0,034
	12,73	26,10	0,032	12,73	29,30	0,034
	14,18	14,57	0,033	14,18	19,81	0,036
	16,97	2,45	0,033	16,97	3,75	0,030
	18,90	1,00	0,036	18,90	1,30	0,039
	20,92	0,49	0,029	20,90	0,65	0,042
	22,05	0,30	0,030	22,05	0,42	0,043
	24,90	0,12	0,043	24,83	0,17	0,051
	27,00	0,09	0,046	26,97	0,10	0,058

**Tabela B.3:** Dados referentes à primeira utilização e reutilização das esferas de ProRestart<sup>®</sup> com carga de 200 g/L, na fermentação descontínua de mosto sem agitação do meio.

	Original			Duplicado		
	t (h)	[açúcar] (g/L)	DO	t (h)	[açúcar] (g/L)	DO
<b>1ª Fermentação</b>	0,00	207,00	0,035	0,00	207,00	0,035
	0,01	168,50	0,109	0,01	167,50	0,121
	0,08	152,50	-	0,08	159,00	-
	0,17	145,00	0,113	0,17	153,50	0,124
	0,55	141,00	-	0,55	143,50	-
	2,00	127,00	0,103	2,00	134,50	0,114
	2,97	107,00	-	2,97	114,00	-
	4,33	88,00	0,104	4,33	96,00	0,119
	5,55	69,50	-	5,55	73,00	-
	6,23	59,50	0,122	6,23	64,00	0,125
	7,02	48,25	-	6,97	54,50	-
	7,92	36,00	0,108	7,87	40,00	0,118
	18,80	0,10	-	18,78	0,12	-
	19,83	0,05	0,124	19,83	0,06	0,123
	21,88	0,05	-	21,88	0,04	-
	23,45	0,00	-	23,45	0,00	-
	26,72	0,00	0,136	26,72	0,00	0,145
<b>Reutilização</b>	0,00	207,00	0,035	0,00	207,00	0,035
	0,01	162,50	0,039	0,01	156,00	0,043
	0,09	145,50	-	0,09	144,00	-
	0,17	140,00	0,048	0,17	135,50	0,042
	0,53	128,00	-	0,52	128,50	-
	1,43	116,00	0,035	1,43	114,50	0,034
	2,72	98,00	-	2,65	95,00	-
	3,72	77,50	0,036	3,67	77,50	0,030
	5,47	51,00	-	5,42	48,00	-
	13,85	0,21	0,041	13,78	0,25	0,041
	16,65	0,13	-	16,63	0,05	-
	18,18	0,01	0,042	18,18	0,01	0,043
	19,37	0,00	-	19,37	0,00	-

**Tabela B.4:** Dados referentes à primeira utilização e reutilização das esferas de ProRestart® com carga de 250 g/L, na fermentação descontínua de mosto sem agitação do meio.

	Original			Duplicado		
	t (h)	[açúcar] (g/L)	DO	t (h)	[açúcar] (g/L)	DO
<b>1ª Fermentação</b>	0,00	205,00	0,034	0,00	205,00	0,034
	0,01	162,50	0,151	0,01	160,00	0,127
	0,09	147,50	-	0,09	145,00	-
	0,18	139,50	0,153	0,18	139,00	0,130
	0,26	137,00	-	0,26	137,50	-
	0,51	128,50	0,154	0,51	131,50	0,129
	1,93	109,50	-	1,93	109,00	-
	3,07	88,00	0,178	3,07	84,50	0,166
	4,03	73,25	-	4,03	69,50	-
	5,07	56,00	0,176	5,07	52,75	0,174
	6,07	33,50	-	6,07	31,00	-
	7,53	18,81	0,198	7,53	14,19	0,185
	8,53	7,22	0,169	8,53	4,86	0,161
	9,53	2,49	-	9,53	1,44	-
<b>Reutilização</b>	0,00	205,00	0,034	0,00	205,00	0,034
	0,01	136,50	0,034	0,01	137,00	0,036
	0,09	110,50	-	0,09	114,00	-
	0,17	105,00	0,036	0,18	108,50	0,036
	0,22	98,00	-	0,21	95,50	-
	0,43	94,00	0,034	0,42	98,00	0,037
	1,38	75,50	-	1,38	80,00	-
	2,62	52,75	0,035	2,62	54,00	0,036
	4,50	18,45	-	4,50	24,70	-
	5,93	3,08	0,046	5,93	3,24	0,048
	6,90	0,98	-	6,90	1,04	-
	8,07	0,31	0,048	8,07	0,34	0,048
	9,42	0,13	0,065	9,42	0,13	0,063

**Tabela B.5:** Dados referentes à primeira utilização e reutilização das esferas de ProRestart® com carga de 320 g/L, na fermentação descontínua de mosto sem agitação do meio.

	Original			Duplicado		
	t (h)	[açúcar] (g/L)	DO	t (h)	[açúcar] (g/L)	DO
<b>1ª Fermentação</b>	0,00	207,50	0,032	0,00	207,50	0,032
	0,01	159,00	0,187	0,01	147,50	0,186
	0,09	136,50	-	0,09	130,50	-
	0,17	132,00	0,215	0,17	127,00	0,247
	0,34	121,00	-	0,34	119,50	-
	0,50	118,50	0,238	0,50	113,50	0,257
	1,00	89,50	-	1,00	85,00	-
	2,05	76,50	0,286	2,00	74,25	0,299
	3,03	47,75	-	3,03	45,25	-
	4,07	33,12	0,333	4,07	30,72	0,344
	5,07	11,70	-	5,07	9,60	-
	6,00	2,90	-	6,00	2,32	-
	6,62	1,39	0,409	6,62	1,19	0,425
<b>Reutilização</b>	0,00	207,50	0,032	0,00	207,50	0,032
	0,01	129,00	0,020	0,01	116,50	0,03
	0,09	104,00	-	0,09	100,50	-
	0,17	97,50	0,029	0,17	88,00	0,029
	0,34	86,50	-	0,34	80,00	-
	0,50	80,00	0,073	0,50	73,50	0,039
	1,77	54,50	-	1,27	47,00	-
	2,53	7,02	0,051	2,53	10,92	0,063
	3,85	1,05	-	3,85	0,77	-
	6,01	0,37	0,062	6,01	0,36	0,069

## ANEXO C: Fermentação Descontínua de Mosto com Agitação do Meio

**Tabela C.1:** Dados referentes à fermentação descontínua de mosto com agitação do meio para as cargas de ProRestart® de 100 g/L e 200 g/L.

100 g/L				200 g/L			
t (h)	[açúcar] (g/L)	DO	Etanol (% v/v)	t (h)	[açúcar] (g/L)	DO	Etanol (% v/v)
0,00	205,50	0,020	-	0,00	205,50	0,023	-
0,01	193,00	0,053	-	0,01	170,50	0,105	-
0,12	185,00	-	1,0	0,10	156,50	-	1,6
0,27	179,50	0,062	-	0,24	148,00	0,150	-
0,50	174,00	-	1,1	0,50	142,00	-	1,4
1,02	176,00	0,075	-	1,04	138,50	0,195	2,5
2,02	165,50	-	1,4	2,03	121,50	-	2,6
3,12	158,00	0,088	-	3,17	102,00	0,264	-
4,17	146,00	-	-	4,47	79,75	-	4,8
5,12	138,50	0,094	-	5,62	62,75	0,360	-
7,70	108,50	-	4,4	6,72	45,00	-	5,6
10,12	89,00	0,128	-	7,62	34,32	0,438	-
12,33	68,50	-	6,6	8,55	20,88	-	-
16,18	27,72	0,176	-	9,80	8,45	-	7,0
18,42	16,14	-	8,9	11,90	0,6	0,482	7,9
19,53	11,95	0,204	-	-	-	-	-
20,62	6,65	-	9,1	-	-	-	-
21,77	2,98	-	8,5	-	-	-	-
22,67	1,51	0,227	7,9	-	-	-	-

## ANEXO D: Efeito da Temperatura na Fermentação Descontínua de Mosto

**Tabela D.1:** Dados referentes à fermentação descontínua de mosto com uma carga de ProRestart® de 150 g/L à temperatura de 24,5 °C.

Original			Duplicado		
t (h)	[açúcar] (g/L)	DO	t (h)	[açúcar] (g/L)	DO
0,00	108,00	0,030	0,00	108,00	0,030
0,01	97,50	0,059	0,01	103,00	0,057
0,09	96,00	-	0,09	94,50	-
0,17	95,00	0,059	0,17	95,50	0,058
0,34	91,00	-	0,34	92,50	-
0,50	93,25	0,065	0,50	87,25	0,066
1,25	76,50	-	1,25	78,50	-
2,15	64,50	0,076	2,15	62,25	0,067
3,12	44,00	-	3,12	45,00	-
4,30	22,20	0,085	4,30	26,04	0,083
5,15	20,90	-	5,15	11,99	-
6,32	3,33	0,090	6,32	3,87	0,084
7,22	1,46	-	7,22	1,64	-
8,12	0,76	-	8,12	0,84	-
9,75	0,38	0,111	9,75	0,39	0,109

**Tabela D.2:** Dados referentes à fermentação descontínua de mosto com uma carga de ProRestart® de 150 g/L à temperatura de 21,5 °C.

Original			Duplicado		
t (h)	[açúcar] (g/L)	DO	t (h)	[açúcar] (g/L)	DO
0,00	108,00	0,030	0,00	108,00	0,030
0,01	100,62	0,077	0,01	98,28	0,076
0,09	93,50	-	0,09	97,75	-
0,17	94,75	0,077	0,17	94,00	0,078
0,34	91,25	-	0,34	92,75	-
0,87	87,00	0,082	0,87	87,25	0,086
2,00	71,00	-	2,00	75,00	-
3,10	57,00	0,089	3,10	58,00	0,096
4,30	40,75	-	4,30	42,50	-
5,23	28,05	0,092	5,23	31,57	0,100
6,30	14,41	-	6,30	13,75	-
7,35	6,52	0,100	7,35	7,40	0,106
8,73	2,01	-	8,73	2,20	-
10,00	0,91	0,105	10,00	0,97	0,103



**Tabela D.3:** Dados referentes à fermentação descontínua de mosto com uma carga de ProRestart® de 150 g/L à temperatura de 19,5 °C.

Original				Duplicado		
t (h)	[açúcar] (g/L)	DO	Etanol (% v/v)	t (h)	[açúcar] (g/L)	DO
0,00	108,00	0,018	-	0,00	108,00	0,018
0,01	97,50	0,060	-	0,01	94,00	0,059
0,09	90,50	-	-	0,09	90,50	-
0,20	87,50	0,062	1,3	0,20	83,50	0,061
0,42	80,75	-	-	0,43	82,25	-
1,00	78,52	0,068	-	1,00	79,04	0,066
2,07	68,38	-	1,3	2,07	67,34	-
2,95	58,50	0,071	-	2,95	56,00	0,070
4,27	43,75	-	3,3	4,27	42,25	-
5,30	32,75	0,081	-	5,30	31,00	0,075
6,32	17,49	-	-	6,32	17,93	-
7,47	11,35	0,086	5,2	7,47	10,25	0,085
8,98	4,00	-	-	8,98	3,55	-
11,57	0,93	-	-	11,57	0,92	-
12,90	0,59	0,099	5,5	12,90	0,6	0,090

**Tabela D.4:** Dados referentes à fermentação descontínua de mosto com uma carga de ProRestart® de 150 g/L à temperatura de 15,0 °C.

t (h)	[açúcar] (g/L)	DO
0,00	96,50	0,010
0,01	81,50	0,074
0,12	78,00	-
0,32	77,50	0,072
0,87	75,00	-
1,88	73,00	0,074
2,80	69,00	-
4,37	63,00	-
5,57	51,75	0,078
13,72	6,05	0,086
14,78	3,95	-
15,65	2,76	0,090
16,67	1,86	-
17,92	1,36	0,076